UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET PHARMACIE

ANNÉE 1964 N° 637

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RESISTANCE GLOBULAIRE CHEZ LE NOUVEAU-NÉ

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'état)

présentée et soutenue publiquement en Février 1964

par

MADAME VIVIANE LE DOUSSAL

Membres du Jury :
- MM. GUILHEM, Président
- RUFFIÉ
- ESPAGNO — Assesseurs
- DUCOS
- CABANNES, Suppléant

IMPRIMERIE DULAURIER
23, Rue Dulaurier, 23
TOULOUSE
1964

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RESISTANCE GLOBULAIRE CHEZ LE NOUVEAU-NÉ

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET PHARMACIE

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYEN . . . . . MM. **Lazorthes.**
1er ASSESSEUR. . . . . **Blanc.**
2me ASSESSEUR. . . . . **Sorel.**

DOYENS HONORAIRES

MM. **Gorse, Calvet, Lefebvre, Brustier.**

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. **Ribaut, Vallois, Tapie, Delas, Riser**[1] **Bounhoure. Bugnard.**

SECTION MEDECINE

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM.	**Mériel.**
Clinique médicale		**Gadrat.**
Clinique chirurgicale et gynécologie		**Fabre P.**
Clinique chirurgicale et du cancer		**Grimoud.**
Clinique chirurgicale et infantile et orthopédie		**Virenque.**
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques. . . .		**Bazex.**
Clinique des maladies de la tuberculose et pathologie interne		**Morel.**
Clinique des maladies des voies urinaires		**Lhez.**
Clinique médicale infantile et puériculture		**Sorel.**
Clinique médicale de la première enfance		**Bardier.**
Clinique de neuro-chirurgie. . .		**Lazorthes.**
Clinique neurologique et psychiâtrique		**Géraud.**
Clinique obstétricale		**Guilhem Paul.**
Clinique odonto-stomatologique.		**Cadenat H.**
Clinique ophtalmologique. .		**Calmettes.**
Clinique O.R.L. et chirurgie maxillo-faciale		**Calvet.**
Clinique rhumatologique . .		**Ruffié R.**
Clinique traumatologique des membres		**Rieunau.**
Accouchement et obstétricie sociale		**Pontonnier.**
Anatomie		**N.**
Anatomie appliquée.		**Poulhès.**
Anatomie pathologique		**Fabre J.**
Bacteriologie, hygiène et médecine sociale		**Andrieu.**
Chimie biologique		**Valdiguié.**
Electro-radiologie.		**Marquès.**
Embryologie générale.		**Broussy J.**
Histologie.		**Bimes.**
Hydrologie thérapeutique et climatologie.		**Darnaud.**
Médecine légale et médecine du travail.		**Planques.**
Médecine sociale		**N.**
Parasitologie		**Bouisset.**
Pathologie chirurgicale		**Dambrin.**
Pathologie générale et médecine expérimentale. . . .		**Sendrail.**
Physico-chimie		**Auvergnat.**
Physiologie		**Laporte Y.**
Physiologie appliquée et pharmacologie		**Baisset.**
Physique biologique et médicale.		**N.**
Propédeutique médicale. . . .		**Laporte J.**
Thérapeutique		**Dardenne.**

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Anatomie générale et comparée.	MM.	**Coulouma.**
Bactériologie	Mme	**Enjalbert.**
Biochimie médicale		**Douste-Blazy.**
Médecine générale		**Monnier.**
Oto - Rhino - Laryngologie.		**Claux.**
Pathologie médicale.		**Boulard**
Pathologie chirurgicale.		**Lagrot**

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Histologie et embryologie. .		**Planel.**
Ophtalmologie.		**Déodatti.**
Parasitologie		**Ruffié J.**
Physiologie		**Montastruc.**
Physique médicale		**Bru.**

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Anatomie	MM.	**Bastide.**
Anatomie pathologique		**Bouissou.**
Anesthésiologie		**Lareng.**
Carcinologie.		**Estrade.**
Chirurgie générale		**Gédéon.**
Electro-Radiologie		**Pons.**
Hématologie		**Ducos.**
Histologie y embryologie		**Guilhem André.**
Pathologie expérimentale . .		**Gleizes.**
Physiologie		**Bessou.**
Physique médicale		**Commanay.**
Pneumo - phtisiologie.		**Migueres**

AGRÉGÉS

Médecine générale	MM.	**Ribaut.**
		Calazel.
		Rascol.
		Le Tallec.
		Ribet.
Chirurgie générale		**Enjalbert.**
		Ficat.
		Pasquié.
		Souquet.
		Sarrazin.
		Gaubert.
Dermatologie et syphiligraphie		**Dupré.**
Hydrologie.		**Denard.**
Médecine légale.		**Grèzes-Rueff.**
Neuro-Chirurgie		**Espagno Jacq.**
Neuro-Psychiâtrie.		**Gayral.**
Obstétrique		**Espagno.**
Ophtalmologie.		**Bec.**
Pneumo - Phtisiologie . . .		**Delaude.**

AGRÉGÉS LIBRES

Anatomie	MM.	**Thomas.**
Pathologie chirurgicale		**Dleulafé.**

SECTION PHARMACIE

PROFESSEURS

Botanique et cryptogamie. .	Mme	**Dulucq-Mathou.**
Chimie analytique, toxicologie et hygiène industrielle	MM.	**Bourbon.**
Chimie pharmaceutique. . . .		**Blanc.**
Matière médicale.		**Vincent.**
Pharmacie chimique et pharmacodynamie		**Caujolle**
Pharmacie galénique		**Stanislas.**
Zoologie.		**Roux.**

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL

Botanique	M.	**Roques**
Pharmacie.	M.	**Couturier.**
Sciences naturelles.	Mme	**Caujolle.**

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Microbiologie	MM.	**Breuillaud.**
Sciences Physiques		**Pitet.**

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Toxicologie		**Broussy G.**

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Secrétaire principal	MM.	**Roche.**
Secrétaire.		**Berrut.**

La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats.
(Délibération en date du 12 mai 1891.)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547607_0045

A MON PÈRE, A MA MÈRE

A LA MÉMOIRE DE MON BEAU-PÈRE

A MA BELLE-MÈRE

A MON MARI ET MES FILS, PIERRE ET JEAN-MARC

A MES FRÈRES ET SŒUR

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET PHARMACIE

ANNÉE 1964 N° 637

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RESISTANCE GLOBULAIRE CHEZ LE NOUVEAU-NÉ

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'état)

présentée et soutenue publiquement en Février 1964

par

MADAME VIVIANE LE DOUSSAL

Membres du Jury :
- MM. GUILHEM, Président
- RUFFIÉ
- ESPAGNO (Assesseurs)
- DUCOS (Assesseurs)
- CABANNES, Suppléant

IMPRIMERIE DULAURIER
23. Rue Dulaurier, 23
TOULOUSE
1964

MONSIEUR LE PROFESSEUR DUCOS

Maître de Conférence, agrégé d'Hématologie à la Faculté

En reconnaissance de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger cette thèse.

MONSIEUR LE DOCTEUR CABANNES

Vous avez bien voulu nous confier le sujet de cette thèse.

Nous avons travaillé sur vos conseils et selon vos méthodes.

Nous vous devons d'avoir pu mener à bien ce travail.

Nous sommes fiers de vous avoir pour juge et de pouvoir vous exprimer notre gratitude et notre respectueux attachement.

A LA MÉMOIRE DU DOCTEUR MASSONAT

Tombé le 26 mars 1962 à Alger, victime de son devoir

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTÉ D'ALGER

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LAGROT

Professeur à la Faculté

Chirurgien des Hôpitaux

En remerciement de la formation qu'il nous a donnée dans son service de l'Hôpital Mustapha d'Alger.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOULARD

Professeur de Pathologie Médicale

En gage de notre gratitude pour sa bienveillance et la qualité de son enseignement.

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE DE TOULOUSE

A TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE

DE BIOCHIMIE DU CENTRE DE

TRANSFUSION SANGUINE DE TOULOUSE

A notre Président de Thèse

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILHEM

Professeur de Clinique Obstétricale

Il nous a fait le très grand honneur de présider notre Jury de thèse.

Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

A notre Jury de Thèse

MONSIEUR LE PROFESSEUR JACQUES RUFFIE

Directeur du Centre Régional de Transfusion Sanguine

Il nous a permis de réaliser ce travail en nous accueillant dans son service.

Qu'il soit assuré de notre profonde reconnaissance.

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUY ESPAGNO

Agrégé d'Obstétrique

Avec nos remerciements pour l'honneur qu'il nous fait en participant à notre Jury de thèse.

INTRODUCTION

La résistance globulaire osmotique chez l'adulte, l'enfant et le nourrisson a fait l'objet de nombreux travaux qui ont établi les données de la fragilité érythrocytaire dans les conditions physiologiques, pathologiques et expérimentales.

On a étudié ces mêmes données chez le nouveau-né, cependant celles-ci demeurent fragmentaires, peu précises. Elles n'ont pas fait l'objet d'études récentes.

Il nous a paru intéressant de reprendre ces recherches concernant la fragilité osmotique des hématies du nouveau-né dès la naissance. A ce moment, en effet, l'organisme se trouve soumis à un changement radical dû aux phénomènes d'adaptation et les variations des structures cellulaires qui en résultent retentissent en particulier sur le comportement érythrocytaire.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biochimie du Centre Régional de Transfusion Sanguine ; nous avons utilisé pour nos recherches des échantillons de sang de cordon provenant de la clinique obstétricale de la Faculté de Médecine de Toulouse.

Dans la première partie de cet exposé, nous avons rassemblé les données récentes essentielles sur la physiologie de l'hémolyse « in vivo » et en particulier sur le mécanisme de l'hémolyse néo-natale.

Nous étudions ensuite l'hémolyse osmotique réalisée expérimentalement. Nous avons comparé pour mieux comprendre le phénomène, la résistance globulaire osmotique chez l'adulte, l'enfant, le nourrisson et le nouveau-né.

La seconde partie de ce travail est consacrée à l'énoncé de nos résultats et à nos commentaires concernant particulièrement la fragilité globulaire du nouveau-né. Chez celui-ci, nous avons comparé les résultats de la résistance osmotique des hématies avec certaines constantes biologiques dont les variations sont en rapport avec certains états hémolytiques dès la naissance.

Pour toutes ces épreuves nous avons utilisé, sans la modifier outre mesure, une technique d'étude dont l'originalité revient à H. *et* G. Diacono (38). *Ceux-ci en même temps que* Ponder *ont bien montré que le test de résistance globulaire pouvait être un témoin fidèle des modalités d'hémolyse, à la condition toutefois d'être apprécié d'une façon particulière.*

SOMMAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER : L'HÉMOLYSE « IN VIVO ».

I. — *Physiologie de l'hémolyse « in vivo ».*

A) Modifications biochimiques survenant au cours du vieillissement cellulaire.

B) Rappel du catabolisme de l'hémoglobine au cours de la destruction cellulaire.

II. — *Physiologie de l'hémolyse néo-natale :*

1. Hémolyse néo-natale physiologique.
2. Mécanisme de l'ictère simple du nouveau-né.
3. Facteurs de l'hémolyse néo-natale pathologique.

CHAPITRE II : L'HÉMOLYSE OSMOTIQUE EXPÉRIMENTALE.

A) *L'hémolyse « in vitro » :*

1. Définition de l'hémolyse.
2. Etude de la physiologie de l'hémolyse osmotique.
3. La représentation graphique de l'hémolyse.

B) *Les méthodes d'expérimentation :*

I. — Historique des techniques.

II. — Exposé des résultats :

1. Principe et définition.
2. Etude comparée des valeurs normales chez l'adulte, l'enfant et le nouveau-né.
3. Facteurs influençant la résistance globulaire osmotique.

A : Facteurs cellulaires.

B : Facteurs extra-cellulaires.

CHAPITRE III : Travaux personnels.

I. — *Technique utilisée dans ce travail.*

II. — *Expression des résultats.*

III. — *Résistance globulaire et autres Constantes Biologiques du nouveau-né à l'état normal et pathologique.*

I. Résistance globulaire et Réticulocytes.

II. Résistance globulaire et hémoglobine alcalino-résistante.

III. Résistance globulaire et bilirubinémie.

CONCLUSION.

BIBLIOGRAPHIE.

Chapitre I.

L'HEMOLYSE « IN VIVO »

I. — PHYSIOLOGIE DE L'HÉMOLYSE « IN VIVO ».

Les hématies d'un sujet normal demeurent un certain temps dans le courant sanguin, mais chaque jour un nombre important de globules rouges disparaît, tandis qu'un nombre équivalent de cellules jeunes les remplace, grâce à l'activité érythropoïetique de la moelle osseuse.

La durée de vie de l'hématie, à partir du moment où elle a été mise en circulation jusqu'à sa destruction physiologique, a été évaluée grâce à plusieurs méthodes. Actuellement on sait qu'elle est de 110 à 120 jours. Ces chiffres ont été retenus par la méthode dite « agglutination différentielle » d'Ashby et surtout grâce à l'introduction de l'utilisation des isotopes. L'emploi du N^{15}, du C^{14}, du Fe^{55}, du Fe^{59} et du Cr radioactif donnent des résultats parfaitement concordants.

Donc les hématies demeurent en circulation pendant 120 jours puis subissent une destruction physiologique. On admet que celle-ci dépend de leur sénescence et qu'il se produit une destruction des seules hématies ayant atteint l'âge limite.

A) Modifications biochimiques survenant au cours du vieillissement cellulaire :

Les trois phases de la vie de l'hématie sont représentées par la courbe de Shemin et Rittenberg (fig. 1), qui exprime les variations en N^{15} de l'hémoglobine humaine en fonction du temps après l'ingestion de glycocolle N^{15}.

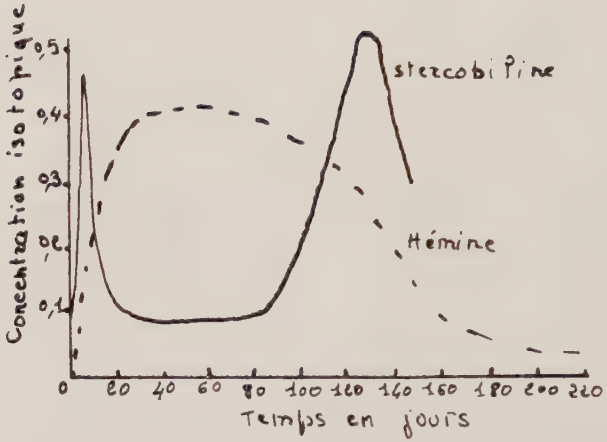

Fig. 1. — Durée de vie du globule rouge humain mesurée par l'hémine marquée après ingestion de glycocolle étiqueté à l'azote lourd (en traits discontinus) élimination de stercobiline marquée (en trait plein)

— Dans les jours suivant l'ingestion de glycocolle N^{15}, la concentration de l'hémoglobine en N^{15} s'accroît jusqu'à atteindre un plateau aux alentours du 15e jour. Cette phase correspond à l'apparition progressive dans la circulation de globules rouges jeunes.

— Le plateau dure jusqu'aux environs du 100e jour. Il n'apparaît pas de globule rouge marqué après le 15e jour et surtout les globules marqués vont survivre jusqu'au 100e jour sans subir apparemment d'échanges métaboliques quant à l'hémoglobine.

— Après le 100e jour, il y a décroissance de la concentration en N^{15} de l'hémoglobine, qui traduit la destruction des globules rouges marqués.

1. — Modifications biochimiques des constituants non-hémoglobiniques du globule rouge :

a) *Modifications lipidiques :*

Les lipides diminuent ce qui contribue à l'augmentation

de densité observée. Cette diminution pourrait être provoquée par une usure mécanique en raison des frictions subies par les enveloppes externes de l'hématie dans les capillaires.

b) *Modifications ioniques :*

Il y a baisse de potassium intracellulaire et une augmentation de sodium.

Le globule rouge vieux présente une activité enzymatique diminuée de façon globale, mais très importante au niveau des enzymes du métabolisme glucidique. Il s'ensuivrait une baisse de la production énergétique dans la cellule sénescente qui ne pourrait plus assumer de façon correcte son isoosmolarité.

c) *Modification enzymatiques :*

Tous les enzymes glycolytiques, sauf la lactico déshydrogénase, ont une activité décrue dans les globules rouges âgés. Les modifications de la glycolyse jouent vraisemblablement un rôle très important dans le mécanisme de la mort du globule rouge. Or, elles sont dominées par une diminution de l'activité d'enzymes telles la 3-phosphoglycéraldéhyde-déshydrogénase et la glucose-6-phosphate-déshydrogénase. On ne sait pas par quel mécanisme se fait cette destruction enzymatique, à l'heure actuelle.

Sauf dans le cas des déficiences en glucose-6-phosphate-déshydrogénase on n'a pas trouvé jusqu'ici de globules rouges pathologiques dont le raccourcissement de la vie s'expliquerait par une accélération des phénomènes normaux de sénescence.

2. — Modifications de l'hémoglobine :

— Des expériences faites par Dreyfus et Kruh (35), puis Schapira et Rosa (85), montrent que des remaniements métaboliques interviennent dans la globine pendant la vie du globule

rouge ; alors que, jusque-là, l'inertie métabolique de l'hémoglobine était considérée comme solidement établie. Il y aurait un remaniement de la globine avec échanges d'acides aminés, mais le rythme de ce renouvellement a-t-il une relation avec le vieillissement ?

Au cours de la vie du globule, on a décrit une méthémoglobinisation discrète et des modifications de charge portant sur une fraction de l'hémoglobine.

— Schlegel et coll. (87) ont décrit des migrations électrophorétiques différentes selon que l'hémoglobine humaine était préparée à partir de globules rouges, jeunes ou vieux.

— Schapira et Rosa montrent que l'aspect électrophorétique des hémoglobines de globule rouge de lapin varie avec l'âge des globules rouges. Ils proposent l'interprétation suivante : au cours du vieillissement globulaire, une fraction de l'hémoglobine subit des modifications. La fraction modifiée, devenue plus électronégative à pH 8,6 migre plus rapidement et vient se placer en avant de la tache principale. Mais il n'est pas encore possible d'expliquer pourquoi seule une portion d'hémoglobine subit de telles modifications.

— Les transformations que subit le globule rouge permettent sa destruction par le système réticulo-endothélial. Mais on ignore encore quel est le degré de modification que le globule rouge doit subir pour que le système réticulo-endothélial le traite comme un corps étranger.

B) **Rappel du catabolisme de l'hémoglobine au cours de la destruction cellulaire :**

La molécule d'hémoglobine est formée par l'union d'une protéine, la globine, et d'un groupement prosthétique, l'hème, qui se compose de protoporphyrine sur laquelle est fixé un atome de fer bivalent.

La dégradation de l'hémoglobine débute à l'intérieur de l'hématie par sa transformation en méthémoglobine, où l'atome de fer est bivalent. Le cycle tétrapyrrolique se rompt et il y aurait libération d'un atome de fer, ces phénomènes étant antérieurs à la scission de la copule protéinique.

La mesure de la bilirubinémie indirecte, qui correspond à la bilirubinoglobine contenue dans le plasma sanguin permet d'apprécier l'intensité des processus d'hémolyse : chez le sujet normal, le taux est de 3 à 6 mg chez l'adulte.

A un second stade, l'hémoglobine est catabolisée au niveau du foie. Il se fait une scission de la molécule de bilirubinoglobine en globine et bilirubine, celle-ci étant excrétée par les voies biliaires.

Enfin, la dernière étape est intestinale ; la bilirubine, par une série de dégradations progressives, est transformée en urobilinogène, en partie réabsorbé et qui peut subir au niveau du foie une réutilisation dans la synthèse du pigment. Il est éliminé d'une part et en faible quantité par les reins, c'est l'urobilinurie physiologique ; d'autre part, grâce à l'activité enzymatique des bactéries intestinales, il est dégradé en stercobilinogène puis stercobiline et éliminé.

3. — Le rôle de la rate dans l'hémolyse in vivo :

La rate exerce une action régulatrice en éliminant les formes les moins résistantes, qui sont remises en circulation dans des conditions pathologiques précises. Il est vraisemblable que le passage splénique rend les hématies plus sensibles à l'hémolyse et diminue leur résistance. Après une splénocontraction par l'adrénaline, on constate une diminution de la résistance des globules rouges de la veine splénique par rapport à ceux de l'artère splénique. Mais, dans les transfusions, la diminution de la résistance globulaire osmotique du receveur a été interprétée par Pellegrini (68) comme étant due à la mise en circulation de globules de dépôt, vieux et sénescents, par splénocontraction et mobilisation.

II. — PHYSIOLOGIE DE L'HEMOLYSE NEO-NATALE

1. **Hémolyse néo-natale physiologique :**

Les conditions de la vie fœtale diffèrent d'une manière fondamentale avec celles de la vie extra-utérine, et s'exercent en particulier, d'une manière directe sur l'hématopoièse ; celle-ci, qui était hépato-splénique, devient progressivement médullaire. La synthèse de l'hémoglobine fœtale diminue dès avant la naissance pour laisser la place à la synthèse de l'hémoglobine adulte. La capacité de fixation des globules rouges se trouve elle-même modifiée puisque, passant des conditions d'anoxie relative, elle se trouve tout d'un coup livrée à une pression d'oxygène beaucoup plus importante. Ceci se traduit par des constatations hématimétriques : à la naissance, le chiffre de globules rouges oscille de 4 800 000 à 5 500 000 ; il subit une légère augmentation dès les premières heures, puis diminue progressivement pour atteindre le chiffre de 4 000 000 à la fin du premier mois. Parallèlement, la chute du taux d'hémoglobine conduit à la formation d'hématies de tendance légèrement hypochrome.

Tous ces problèmes laissent supposer que, chez le nouveau-né, l'organe érythrocytaire se trouve profondément mais progressivement modifié dans les conditions normales, c'est-à-dire que le stock de globules rouges fœtaux est peu à peu remplacé par des érythrocytes nouveaux, adaptés à la vie extra-utérine. Il semble bien qu'il soit nécessaire de considérer que cette substitution se fait à la faveur d'un processus hémolytique qui passe inaperçu dans les conditions physiologiques, mais qui peut être révélé brutalement ou progressivement dans certaines conditions pathologiques.

Dans les conditions normales, l'érythroclasie physiologique du nouveau-né est le résultat de plusieurs facteurs :

1° L'élévation brutale de la tension d'oxygène, qui provoque la destruction d'une partie des hématies. Ceci est la

conséquence de l'adaptation morphologique de l'érythrocyte à l'oxygénation directe : aplatissement et étalement, conditionnant l'augmentation de la capacité corpusculaire de fixation.

2° Les perturbations dans les rapports volumes plasmatique et globulaire, résultat de l'hémoconcentration post-natale passagère.

3° Raccourcissement de la durée de vie des hématies à la fin de la vie du fœtus (MOLLISON [65]).

4° Freination de l'activité des centres hématopoiétiques qui ne sont plus stimulés par l'anoxie fœtale.

5° Remplacement du stock de l'hémoglobine fœtale par de l'hémoglobine de type adulte ; dans certaines conditions pathologiques, l'érythroclasie peut être extrêmement importante et brutale. Le nouveau-né ne peut alors réaliser l'excrétion des produits d'hémolyse. Cette destruction globulaire peut être le résultat de facteurs extra-globulaires ne mettant pas en cause la constitution de l'hématie ou de causes globulaires directement responsables de l'hémolyse néo-natale. Ces dernières sont généralement le fait d'un état constitutionnel héréditaire qu'il convient de déceler avant la révélation de la crise hémolytique ou au cours de ses manifestations que nous allons maintenant étudier.

2. Mécanisme de l'ictère simple du nouveau-né :

L'ictère simple du nouveau-né, dit « physiologique », s'inscrit dans le cadre des phénomènes d'adaptation qui suivent la naissance. Il résulte de l'incapacité momentanée du foie à convertir en bilirubine conjuguée la bilirubine libre issue de la destruction globulaire qui suit la naissance.

A la période néo-natale, surtout en cas de prématurité et de débilité, il existe une hyperglobulie physiologique, d'autant plus importante que la ligature du cordon est retardée. La

première inspiration respiratoire de l'enfant provoque une véritable transfusion de sang placentaire dans la circulation du nouveau-né.

Selon Schiff (86), au premier jour de la naissance, on compte 6 031 000 globules rouges et 5 996 000 au troisième jour. Selon Goldbloom et Gottlieb (44), on trouve à la naissance 6 400 000 globules rouges, après 24 heures : 6 000 000 GR, après 48 heures : 5 150 000 GR, après 96 heures : 4 900 000 GR et enfin après 144 heures : 4 500 000 GR. Ainsi, pendant les premiers jours de la vie, il y a eu destruction globulaire. Selon Duong-Ba-Banh (37), cette destruction est particulièrement importante en cas d'ictère néo-natal et, dès le quatrième jour de la vie extra-utérine, cet auteur retrouve des taux de 4 500 000 GR et même de 4 000 000 seulement. Le fœtus *in utero* a son hématose assurée indirectement par l'organisme maternel ; il lui faut donc posséder un grand nombre de globules rouges. Après la naissance s'établit brusquement un processus d'oxygénation direct et puissant, assuré par la respiration. On pourrait, pour expliquer l'inconstance de l'ictère néo-natal, ses degrés de gravité, faire intervenir la fragilité globulaire dans cette hémolyse physiologique. Cathala (21) et Daunay ont écrit qu'à une diminution intense de la résistance globulaire succède un ictère franc, alors qu'à une diminution légère succède un ictère également léger.

Pour certains auteurs, cependant, la résistance globulaire a été trouvée augmentée dans l'ictère néo-natal (Mensi [40]). Pour Hallez (41), la fragilité globulaire n'existerait que dans 52 % des ictères néo-nataux. Pour Slingenberg (90), l'existence ou l'absence d'ictère sont sans rapport avec une variation de la résistance globulaire.

Duong Ba Banh a constaté une diminution de la résistance globulaire au début de l'hémolyse chez les nouveau-nés ictériques, avec des chiffres voisins de ceux obtenus par Cathala.

Chez les nouveau-nés normaux, la moyenne de la résistance

globulaire est de 4,7 pour 1 000 et, en cas d'ictère, la moyenne est de 5,47 pour 1 000.

La présence de pigments biliaires dans le sang du nouveau-né est admise par presque tous les auteurs. Gilbert (40) et Lereboullet, puis Cathala et Daunay (21) l'ont établie et chiffrée. Pour Cathala, la biligénie est constante et très élevée à la naissance, pour atteindre son maximum vers le troisième ou le cinquième jour de la vie, au moment où apparaît cliniquement l'ictère ; puis elle diminue vers le neuvième jour. Pour Fujimori (38), la teinte ictérique des téguments apparaît avec une bilirubinémie de 9,23 à 16,3.

L'incapacité passagère du foie est liée, non à une maladie de la cellule hépatique, mais seulement à une insuffisance momentanée de son équipement enzymatique. Chez le nouveau-né normal, la faculté du foie de transformer la bilirubine « libre » en bilirubine conjuguée peut être 50 à 100 fois inférieure à celle du foie adulte. Par des expériences *in vitro,* on a établi que le foie du nouveau-né ne synthétise qu'une petite quantité de glycuronides de la bilirubine, même en présence d'acide uridine-diphosphateglycuronique, donc la glycuronide-transférase est en défaut à la période néo-natale et le facteur conditionnel de l'ictère simple apparaît comme un défaut enzymatique transitoire.

Pour Debré (31), la participation hémolytique est mineure, elle peut accroître le travail normal du foie car les hématies du nouveau-né sont plus fragiles et ne survivent pas aussi longtemps que celles de l'adulte lorsqu'on les transfuse (Hsia [54]).

La bilirubine indirecte n'est pas excrétable par le rein, ce qui explique son accumulation en amont et l'absence de pigments biliaires dans les urines.

3. — Facteurs de l'hémolyse néo-natale pathologique :

Les facteurs physiologiques sont donc les modifications de la tension en oxygène du sang du nouveau-né auxquelles s'adaptent les hématies.

Les facteurs pathologiques sont soit intra-globulaires, soit extra-globulaires.

a) Facteurs intraglobulaires :

1. - *Les enzymes :*

L'étude de certaines anémies hémolytiques médicamenteuses, tel que le tableau hémolytique aigu provoqué par l'ingestion de Primaquine, a permis de décrire un nouveau mécanisme d'hémolyse intraglobulaire et de regrouper une série d'anémies hémolytiques ayant toutes en commun un même déficit enzymatique congénital. Le cadre de l'affection est très large et de très nombreux corps sont responsables d'anémies du même type : le favisme comporte le même déficit, certaines infections microbiennes auraient le même mécanisme hémolytique. On a pu prouver que l'anomalie est globulaire et l'étude comparative des hématies sensibles et de celles de sujets sains a montré que les hématies malades ont : un taux abaissé de glutathion réduit, le glutathion oxydé est normal, une augmentation de certaines enzymes = glutathion reductase et aldolase, mais surtout un déficit considérable en glucose-phosphate déshydrogénase plus marqué dans les cellules âgées et c'est ce trouble qui semble fondamental, les autres n'étant qu'induits par lui. (Observations princeps de Doxiadis, Fessas, Valaes [34'].)

Dans des conditions normales, l'augmentation de glutathion oxydé assure la vie de l'érythrocyte, mais c'est une cellule fragile, qui s'hémolyse dès que certains produits chimiques sont

introduits dans le sang. Cette hématie ne pourrait se protéger contre les processus d'oxydation ou aurait des possibilités énergétiques diminuées, ce qui l'empêcherait de limiter la pénétration intracellulaire du sodium, donc de l'eau.

C'est une maladie congénitale qui prédominerait dans certains groupes ethniques tels que les noirs américains, en Sardaigne, dans certains groupes caucasiens et quelques populations juives. Elle est familiale, due à un gène lié au sexe.

2. - *Hémoglobines anormales :*

Une anomalie de la constitution chimique des hématies et en particulier de l'hémoglobine entraîne des modifications de la forme cellulaire et un raccourcissement de la durée de vie globulaire. Ces anomalies hémoglobiniques peuvent être qualitatives ou quantitatives. Il est rare de voir une hémoglobinose se manifester dès les premières heures de la vie. L'anomalie des chaînes β en particulier n'étant révélée qu'à partir du moment où la synthèse de cette chaîne est quantitativement suffisante.

— Les anomalies quantitatives portent sur l'un des acides aminés des chaînes polypeptidiques : d'une manière générale, les globules sont plats, et des variations de la tension d'oxygène provoquent des modifications morphologiques dues à l'apparition de cristaux d'hémoglobine. Les hématies ont alors tendance à s'agglutiner, puis à s'hémolyser. Cette hémolyse n'est pas identique pour toutes les hémoglobinoses ainsi dans l'HbS. maladie, ou sicklanémie, l'hémolyse est massive, tandis que celle de l'HbC maladie est beaucoup moins apparente.

Les anomalies moléculaires se retrouvent pour une trentaine d'hémoglobinopathies, dont les hémoglobinoses S, C, E, etc., etc...

Les anomalies quantitatives portent sur un défaut de la structure de la molécule d'hémoglobine par production insuffisante de l'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Il en est ainsi dans la thalassémie : l'hématie anormale a une durée de vie très brève, de 15 à 20 jours.

b) Causes extra-globulaires :

Chez le nouveau-né, les causes extra-globulaires de l'hémolyse *in vivo* sont représentées par les phénomènes d'iso-immunisation. L'iso-immunisation interhumaine résulte du passage de cellules ou de substances d'un organisme humain dans un autre organisme humain, ce qui donne lieu à la formation d'anticorps spécifiques.

L'immunisation maternelle résulte du passage des hématies fœtales dans la circulation de la mère au cours des dernières semaines de la grossesse. La production d'anticorps suppose que les hématies fœtales restent intactes pendant quelques jours et ne soient pas détruites par des anticorps naturels, en particulier anti A ou anti B. La mère répond à cette stimulation antigénique par la production d'anticorps anti RH, anti A, anti K ou autres. L'aptitude de ces anticorps à traverser le placenta a été mise en évidence par de nombreux auteurs, qui ont réparti les anticorps de sérums humains en deux groupes :

— Les γ globulines légères, dont la constante de sédimentation est de 7 unités Svedberg (S 7), qui pourraient traverser le placenta.

— Les γ globulines lourdes, dont la constante de sédimentation est de 19 unités Svedberg et qui ne traverseraient pas le placenta.

La sensibilisation des hématies est réalisée par la fixation de l'anticorps à leur surface. Les globules vont être détruits en

plus ou moins grande quantité. Cette hémolyse intratissulaire aboutit à un excès de bilirubine libre, qui doit être éliminé. Mais chez le nouveau-né, le système enzymatique du foie est incomplet et la barrière hémo-cérébrale est perméable. Si la bilirubine est produite en trop grande quantité, la glycuro-conjugaison hépatique ne se fait pas d'une manière suffisante et cela peut aboutir à l'ictère nucléaire avec lésions irréversibles des cellules nerveuses par action de la bilirubine.

Donc, les anticorps ainsi formés jouent le rôle d'hémolysines vis-à-vis des hématies fœtales et la gravité de la maladie hémolytique du nouveau-né dépend du degré de sensibilisation des cellules et du fonctionnement hépatique.

CHAPITRE II

L'HEMOLYSE OSMOTIQUE EXPERIMENTALE

A) **L'hémolyse « in vitro »** :

1° DÉFINITION DE L'HÉMOLYSE :

L'hémolyse se caractérise essentiellement par la diffusion et la dissolution de l'hémoglobine globulaire dans le milieu où se trouvent les hématies.

La destruction cellulaire n'est réalisée que lorsque l'hémolyse s'accompagne de la protéolyse des stromas. Pour DIACONO (33), il serait préférable de réserver à ce processus le terme « d'érythrocytolyse ».

L'hémolyse peut être provoquée par des causes les plus diverses :

Facteurs de l'hémolyse :

a) Facteurs physiques : Le type en est l'hémolyse par hypotonie et dans l'eau distillée ; c'est le mode le plus simple et qui permet d'étudier le plus facilement le mécanisme du phénomène hémolytique.

b) Facteurs chimiques :

Ce sont des substances chimiquement définies et dont l'action s'exerce en milieu isotonique. Les plus intéressantes sont :

— les acides et les bases ;

— les dissolvants neutres : alcools, éthers, aldéhydes, acétone, chloroforme, etc... ;

— les glycosides (tels que saponines, digitonine, digitaline) ;

— les lipoïdes, acides gras, sels biliaires et savons.

c) Facteurs biologiques :

Les uns sont indépendants des réactions d'immunité, ce sont les hémolysines d'origine microbienne, animale ou végétale.

Les autres réalisent une hémolyse qui découle de certaines réactions antigène-anticorps et qui résulte d'une réaction de spécifité immunologique.

Nous n'étudierons ici que l'hémolyse osmotique par hypotonie. Bien que produite par des facteurs très divers, l'hémolyse se manifeste sous une forme toujours identique qui est la diffusion de l'hémoglobine. L'hémolyse par hypotonie représente le type le plus simple et permet l'étude du comportement de l'hématie en voie d'hémolyse.

Il faut distinguer :

— d'une part l'hémolyse par rupture de la membrane (hémolyse mécanique), qui se traduit par l'expulsion brutale d'une partie du contenu globulaire ;

— d'autre part l'hémolyse osmotique, qui paraît être placée sous la dépendance des phénomènes physico-chimiques suivants :

a) Pénétration de l'eau dans le corps du globule par osmose, le stroma se comportant comme une membrane semi-perméable.

b) Hydratation, imbibition plus ou moins grande des complexes colloïdaux du globule sous l'influence :

1. De l'action qualitative des ions libres de la solution au sein de laquelle baignent les hématies ;

2. De la teneur des hématies en lipoïdes et du taux de leurs coefficients lipocytiques.

WILBRANDT (102) classe les hémolyses en trois catégories :

— *L'hémolyse purement osmotique,* où le contenu de l'érythrocyte équivaut à une solution d'électrolytes purs.

— *L'hémolyse colloïdo-osmotique,* où le gonflement osmotique modifié par la présence de substances colloïdales intracellulaires ne dépasse pas un certain stade. Il se produit alors une diffusion de l'hémoglobine. Il n'y a pas d'érythroclasie.

— *L'hémolyse non-osmotique,* où l'hémoglobine se dissout par voie chimique et passe à travers la membrane sans rencontrer d'obstacle ; il n'y a pas gonflement érythrocytaire (hémolyse chimique ou mécanique), il y a érythroclasie sans gonflement préalable.

Actuellement, on admet la nature osmotique de presque toutes les hémolyses, biologiques et expérimentales, n'entraînant pas la destruction préalable du stroma. Le globule rouge étant constitué par une charpente protéique, l'hémolyse *in vivo* ne peut être purement osmotique ; mais, d'autre part, il est impossible de réaliser une hémolyse non osmotique dans le domaine expérimental, sauf dans le cas d'une destruction brutale des stromas.

La membrane érythrocytaire étant mise en présence de solvants des lipides, on ne constate pas de passage de l'hémoglobine dissoute à travers la membrane, mais il se produit une destruction de la charpente protéique. Depuis les travaux de WILBRANDT (1940) (102), il est établi qu'une hémolyse non osmotique stricte est inconcevable : il ne peut y avoir de perméabilisation de la membrane à l'hémoglobine non accompagnée d'une perméabilisation aux cations.

2° Etude de la physiologie de l'hémolyse osmotique. - ses différents stades.

1. — *Le gonflement érythrocytaire :*

A) La membrane qui limite l'érythrocyte est traversée très rapidement par l'eau dans des solutions hypotoniques. Il se produit un gonflement par passage d'eau et de sodium, tandis que le potassium quitte le globule en quantité égale ou inférieure au sodium. Chaque globule peut donc fonctionner comme un osmomètre.

En milieu hypertonique : il perd de l'eau, son volume diminue, il s'aplatit.

En milieu hypotonique : il absorbe de l'eau, son volume augmente, il se produit un gonflement.

Les variations de volume ont été étudiées dans des tubes à hématocrite en remplaçant le plasma par la solution.

Par pénétration de l'eau et échange des ions Na et K, le globule perd sa forme biconcave et devient biconvexe par retournement de ses faces concaves. L'épaisseur augmente tandis que le diamètre diminue. Il tend à devenir sphérique jusqu'au « stade prélytique » où le processus est devenu irréversible.

Ponder (72) décrit quatre phases à ce phénomène en mesurant le diamètre, l'épaisseur et la surface globulaires, en fonction du volume :

a) Le globule devient biconvexe et son volume augmente d'environ 15 % ; ensuite, le volume s'accroît par accentuation de la biconvexité, le rapport diamètre/épaisseur diminue, la surface s'accroît peu.

b) Le globule devient un sphéroïde d'une faible excentricité puis une sphère ($\frac{d}{e} = 1$) la surface diminue. Ce moment

correspond à des formes différentes pour chaque globule. Dans une population d'hématies, le volume corpusculaire moyen atteint 130 % environ du volume initial moyen. Quelques globules peuvent cependant conserver leur forme biconcave, leur volume apparaissant accru par une augmentation de leur épaisseur ou un épaississement de leurs extrémités. D'autres ont une forme de cupule. Des globules présentant à l'état initial des échinulations (forme en oursin), les conservent en plasma hypotonique.

c) La sphère s'accroît, la surface du globule tend à retrouver sa valeur initiale.

d) Lorsque le globule sphérique a acquis sa surface initiale, l'hémolyse se produit. Le stroma peut reprendre rapidement sa forme discoïde.

B) **Le globule rouge en tant qu'osmomètre, selon** PONDER (72)

En considérant, pour simplifier, selon PONDER, le globule rouge comme un osmomètre parfait, on peut écrire que :

$$V = W \left(\frac{1}{T} - 1\right) + 100$$ où T figure la tonicité de la solution hypotonique, V le volume acquis par le globule, exprimé en pourcentage du volume initial, et W la quantité d'eau contenue initialement dans le globule, exprimée en pourcentage du volume initial. Cette équation représente la relation de l'équilibre osmotique, tant que la tonicité n'atteint pas la limite correspondant à l'éclatement du globule. Mais cette relation, en général, n'est pas satisfaite, et pour la rendre exacte il faut faire intervenir un coefficient R, dont les valeurs s'échelonnent entre 0,5 et 1. Lorsque R = 1, le globule se comporte comme un osmomètre parfait, les échanges entre milieu et cellule se font sans destruction globulaire ; il devient de plus en plus imparfait au fur et à mesure que R s'éloigne de 1. La relation s'écrit alors :

$$V = R\,W\left(\frac{1}{T} - 1\right) + 100$$

Diverses interprétations de l'anomalie R ont été données :

— Pour Cristol et Bénézech (28), le pourcentage d'eau libre et d'eau liée joue dans cette relation :

Seule une partie de l'eau globulaire est osmotiquement libre, c'est celle dans laquelle diffusent les ions Cl. Cette eau libre s'oppose à l'eau liée aux molécules protéiques, dont l'hémoglobine, inutilisable osmotiquement.

Chez l'adulte, pour 1 000 cc de globules rouges, ces auteurs trouvent 500 cc d'eau libre et 200 cc d'eau liée. Si par W on entend, non plus l'eau totale (70 %) mais l'eau libre (50 %), R est égal à 0,71.

Mais le comportement des globules rouges varie avec la tonicité du milieu : ils suivent les lois de l'osmose dans un milieu isotonique (T = 1) et s'en éloignent de plus en plus lorsque T diminue.

— Une autre explication est donnée par les échanges ioniques entre milieu et globule. La cellule perd des ions potassium osmotiquement actifs, ce qui diminue la tonicité intérieure et provoque un gonflement moindre. Mais cette perte de potassium n'explique pas les basses valeurs de R que l'on rencontre.

— Ponder (71) montre que les valeurs de R sont basses dans les systèmes contenant des globules crénelés ne se comportant plus comme un ballon mais comme une masse de gel et leur structure rigide empêche le gonflement.

Différents facteurs interviennent donc et il n'est pas possible d'appliquer au globule rouge les lois de l'osmose sans restriction.

2° *Le phénomène de lyse.*

Le globule atteint un « volume critique » (Ponder), à ce stade le processus est irréversible. Cest la phase « lytique » caractérisée par la fuite de l'hémoglobine et des autres constituants globulaires. Dans le seul cas de l'hémolyse par hypotonie, les résidus peuvent reprendre immédiatement la forme discoïdale. La dernière étape de l'hémolyse serait la stromatolyse qui correspondrait à la dissolution totale dú stroma, mais cette dernière phase a été peu étudiée.

La loi du tout ou rien.

De nombreux auteurs, dont Hendry (53), soutiennent qu'une hémolyse partielle est constituée par l'hémolyse totale d'une partie des globules rouges et que la constance de la valeur globulaire après hémolyse osmotique est en contradiction avec une libération partielle de l'hémoglobine de chaque cellule.

Des images cinématographiques enregistrées par Commandon et de Fonbrune montrent que sous l'influence de l'eau des solutions hypotoniques, comme de la saponine, les hématies d'abord gonflées, sous l'action de la pression intérieure, s'ouvent brusquement en un point de leur surface. Par cette déchirure, une partie du contenu globulaire est violemment expulsé, puis l'hémoglobine diffuse lentement. On ne voit pas sur le résidu globulaire trace de la déchirure.

Les nombreuses constatations faites lors de l'hémolyse osmotique à l'aide du microscope électronique par Wolpers (104), Wolpers et Zurickan (105), puis Bessis et Bricka (12), montrent une diffusion progressive de l'hémoglobine hors de l'hématie. Des lavages dans de grands volumes d'eau distillée donnent des stromas sans hémoglobine, mais on peut obtenir une hémolyse partielle, c'est-à-dire la sortie d'une partie seulement de l'hémoglobine de chaque globule. Au contraste de phase Bessis trouve à la fois des globules intacts, des stromas et tous les stades intermédiaires. Au microscope électronique, le même auteur voit une membrane plissée chez

les globules partiellement hémolysés, mais l'hématie garde quand même une certaine épaisseur et le stroma montre des plis caractéristiques. Ces observations tendent à nier que l'hémolyse obéisse à la loi « du tout ou rien ».

Mais, d'après PONDER (75), quand un globule rouge est hémolysé, l'hémoglobine qu'il contient est une fonction indéfinie de la concentration d'hémoglobine dans le milieu environnant. Il y a parfois un tel excès d'hémoglobine dans le stroma que l'hémolyse peut être dite « partielle ». L'hémolyse partielle se produit couramment quand la quantité d'eau ajoutée à la cellule est petite, quand de grandes quantités d'eau sont utilisées l'hémolyse semble être du type « tout ou rien ».

En réalité, l'hémolyse sera du type « partiel » ou du type « tout ou rien » selon que l'on mesurera l'hémoglobine dans le liquide environnant les stromas, ou celle contenue dans les stromas ; cette destruction est très importante. En effet, bien qu'il soit possible de conclure que l'hémolyse répond au « tout ou rien » sur la base du premier type d'expérience, le second type, qui nécessite l'utilisation du microscope électronique, peut montrer que toute l'hémoglobine ne s'est pas échappée. L'observation directe du stroma au microscope électronique montre qu'une petite quantité à hémoglobine est retenue, même quand la tonicité est basse et lorsqu'on utilise la méthode des « hémolyses successives » ou des dialyses.

Réversibilité de l'hémolyse osmotique :

Certains auteurs soutenaient l'idée de la réversibilité de l'hémolyse osmotique: BRINKMANN (15) et SZENT-GYORGYI (1923), BAYLISS (1924 [6]), STARLINGER (1925 [91]), DIACONO (1934 [33]). Des hémolysats sont additionnés d'une solution hypertonique de Cl Na de façon à obtenir un système isotonique au sang. La solution s'opacifie et l'examen au microscope montre la réapparition de globules rouges normaux à la place des stromas précédemment dénaturés.

Pour STARLINGER, il y aurait réabsorption de l'hémoglobine dans les stromas, et elle pourrait atteindre 41 % de la quantité d'hémoglobine diffusée.

Aujourd'hui, on sait que le phénomène de l'hémolyse n'est pas réversible. La recoloration du sang lysé par addition de Cl Na repose sur des artéfacts. PONDER (72) a démontré qu'il est impossible, dans une solution de lysine, de réintégrer de l'hémoglobine à l'intérieur du globule rouge. La morphologie globulaire peut redevenir normale mais il n'y a pas retour de l'hémoglobine dans le stroma globulaire.

Observations faites par PONDER (77) *au cours de lyses chimiques :*

Quelle que soit la lysine utilisée, elle réagit avec les composants de la membrane cellulaire de telle sorte qu'il y a rupture de sa semi-perméabilité à l'hémoglobine, c'est-à-dire une dissolution locale ou générale de la continuité des composants de la membrane dont dépendent les propriétés de semi-perméabilité.

La fuite des constituants globulaires, et en particulier de l'hémoglobine, se produit grâce à la rupture de points ou de régions localisées de la membrane cellulaire alors que la lysine agit sur toute la surface. Ces points clefs « Key spots », sont des régions de résistance minima à la lysine. Leur surface totale peut être déduite d'expériences sur le temps mis par l'hémoglobine pour sortir d'une cellule unique durant son hémolyse ou « fadingtime ».

Considérons, à la suite de PONDER (73), des systèmes où des concentrations de lysine approximativement asymptomatiques sont présentes. Le temps de disparition est d'environ 15 secondes, ce qui correspond à une valeur de $Nd = 0{,}25$ où N est le nombre d'endroits perméables et d leur diamètre moyen en μ. Le diamètre de la molécule de l'hémoglobine est d'environ 50 A : le diamètre minimum moyen de ces endroits, à partir desquels diffuse l'hémoglobine serait donc de 50 A ; dans une concen-

tration approximativement asymptotique de lysine pour laquelle Nd = 0,25, le nombre de trous serait de 50.

La structure de la membrane cellulaire est discontinue ; certains points montrent une résistance plus faible que d'autres au cours de la réaction avec la lysine.

La rupture de la membrane en certains points n'est pas le premier phénomène. La lyse est précédée d'une perte de la forme discoïde. Ce changement de forme a une rapidité mesurable. Il survient après une période de latence après l'addition de la lysine. En des endroits localisés de la surface apparaissent des crénations en nombre croissant, alors que le disque se transforme en sphère. Pour toute cellule, le changement de forme est toujours total avant la rupture du « Key spot » le moins résistant, qu'il soit dû au haasrd ou qu'il soit fait sur quelque modèle. Le mode de distribution de ces points de résistance minima, comme des points de résistance supérieure, est inconnu. Dans des systèmes contenant certaines lysines comme la lécithine, le changement de forme survient longtemps avant la lyse, tandis que dans certains systèmes contenant d'autres lysines telles que la saponine, ce changement apparaît relativement tardivement et, est peu après, suivi de lyse.

Ponder étudie cette membrane et la surface cellulaire au microscope électronique. La composition et l'ultra-structure de cette surface varient selon les régions, mais le fait que les endroits les premiers atteints par la lysine sont nombreux et souvent étendus, plaide contre l'idée qu'ils soient composés de substances particulières, n'existant pas ailleurs.

D'autre part, Ponder et Cox (1952 [26]) suggèrent au cours de leurs observations, qu'une altération petite au début, s'étale par la suite (« réactions progressives »). Si l'on considère une surface hautement orientée, la combinaison de molécules de lysine avec des molécules particulières de la surface cellulaire peut agir sur les molécules voisines, désorganisant la forme et la

stabilité de l'ensemble, d'où l'extension à l'ensemble d'un trouble local. Si la pression s'étale, les régions voisines sont comprimées jusqu'à ce qu'une contre-pression égale à la pression d'étalement soit atteinte ; le processus s'arrête alors, sauf si les régions altérées sont proches les unes des autres, cas où elles fusionnent, formant de grands cratères.

III. — La représentation graphique de l'hémolyse.

Brook (16) en 1919, puis Ponder (72), ont établi les notions qui permettent de construire les courbes de variations de l'hémolyse, qui renseignent sur la quantité de globules hémolysés en un temps fixe, dans un milieu hémolytique déterminé. Ces courbes sont :

1. — *La courbe de pourcentage d'hémolyse :*

Pour une dilution constante de la lysine, on détermine le pourcentage de globules rouges hémolysés par rapport au nombre total de globules, en fonction du temps.

2. — *La courbe de résistance globulaire :*

Elle exprime le pourcentage d'hémolyse obtenu, en un temps fixe, par des concentrations variables d'une solution donnée. L'expression différentielle de cette courbe permet de connaître la concentration de lysine pour laquelle se produit la lyse du plus grand nombre de globules rouges. En effet, pour un même agresseur, les conditions d'intensité et de temps varient d'un globule à l'autre. Pour chaque globule, l'intensité et le temps nécessaires pour qu'il y ait hémolyse chiffrent la capacité de résistance du globule. En pratique, la notion de résistance globulaire ne s'applique pas à un seul érythrocyte, mais à une population d'hématies provenant du sang d'un seul sujet. Les globules les plus fragiles sont hémolysés par une faible intensité, les plus résistants nécessitent une forte intensité. On obtient ainsi des courbes en S dont les différentielles permettent de connaître directement la distribution des globules d'après leur résistance indi-

viduelle. La mesure précise d'une résistance globulaire comporte la construction de la courbe d'hémolyse et de la courbe des fréquences.

La forme sigmoïde de la courbe obtenue s'explique par une répartition continue des résistances cellulaires différentielles dans une population cellulaire.

D'autre part la réaction entre cellule et lysine doit être irréversible (il se forme un complexe entre les constituants cellulaires de la membrane et l'agent lytique.

Au cours des lyses chimiques la courbe obtenue est le résultat d'une compétition de hasard de la lysine pour certains endroits de la membrane cellulaire ,la lyse se produisant lorsque un nombre critique de points de la surface ont cédé. Pour rendre compte de la forme de la courbe, l'action cellule-lysine doit se produire en trois phases :

— après addition de la lysine, les cellules sont saturées par une lysine rapide ;

— la lysine réagit sur la majorité des cellules ;

— la réaction se produit avec la minorité des cellules restantes.

3° *La courbe dérivée de* Ponder :

A partir des courbes d'hémolyse, Ponder construit leurs dérivées, ce qui permet d'obtenir les courbes de fréquences représentant la distribution des hématies d'après leur résistance individuelle. Pour dériver ces courbes, on trace les tangentes en plusieurs points (A_1, A_2, A_3, etc.) et on mesure les angles faits par ces droites avec l'axe des abcisses. Les valeurs des tangentes de ces angles sont portées en ordonnées sur les mêmes abcisses que les points A_1, A_2, A_3, etc..., on obtient ainsi les points qui définissent la dérivée.

B) Les méthodes d'expérimentation

I. — Historique des techniques :

En 1873, Malassez (61) fait les premières observations sur les variations de la résistance globulaire. Il décrit en 1895 une méthode de détermination des érythrocytes non hémolysés, utilisant le mélangeur de Potain et basée sur la numération, à intervalles de temps réguliers, des globules rouges résiduels.

Déjà en 1867, Duncan (36) avait signalé chez des sujets atteints de chlorose une augmentation de la fragilité globulaire dans les solutions salées hypotoniques.

En 1880, Chanel (23) décrit une autre méthode pour mesurer la résistance des hématies aux solutions salées hypotoniques et l'applique à des études cliniques. Selon Jolly (57), Chanel fait des suspensions de globules rouges dans des séries de solutions salées de concentrations décroissantes et, après un temp donné, détermine le nombre de cellules détruites en comptant les cellules intactes. Ainsi, il démontre la diminution de la résistance osmotique des érythrocytes dans certaines anémies et son augmentation dans certains types d'ictères. Ce test est quantitatif.

En 1883, Hamburger (50) et Chauffard (24) mettent au point une technique qui recourt aux notions d'hémolyse « commençante » et d'hémolyse « complète » ou totale. Ces deux points marquent les limites de la résistance des globules rouges aux concentrations en chlorure de sodium. Cette méthode a toujours cours ; on lui a apporté de nombreux perfectionnements techniques, mais le principe est resté le même :

Dans une série de tubes contenant des solutions de chlorure de sodium variant de 0,30 à 0,90 %, on ajoute du sang défibriné mesuré en gouttes et on interprète la réaction d'après la coloration du liquide surnageant qui représente la quantité d'hémoglobine dissoute.

L'hémolyse initiale débute par la destruction des globules rouges les plus fragiles, c'est-à-dire des hématies ne résistant pas à des concentrations salines se rapprochant de l'isotonie. L'hémolyse est totale lorsque toutes les hématies sont détruites et qu'il ne persiste pas de culot globulaire dans le tube contenant la solution hypotonique. Un érythrocyte fragile est lysé par une solution de forte tonicité. La coloration du liquide surnageant varie selon la quantité d'hémoglobine diffusée. Ce n'est qu'un témoin de l'hémolyse.

Simmel (1923 [88]), Whitby et Hynes (1935 [100]) basent, comme Chanel, leurs techniques sur la numération. Le premier utilise, au lieu de solutions salines, des solutions (type liquide de Tyrode) où les sels se trouvent dans les mêmes proportions que dans le sang humain, conférant la même pression osmotique que le plasma. Les dilutions sont à 30, 40, 50, 60 et 70 % dans de l'eau distillée.

Simmel publie seulement trois courbes, mais sa méthode est utilisée par Leake et Pratt (1925 [54]) sur 50 hommes et femmes, et dans une forme modifiée par Waugh (1927-1928 [99] sur cinquante hommes normaux, mais leurs résultats ne sont pas superposables parce que les globules rouges des femmes sont, selon leurs conclusions, plus résistants.

Whitby et Hynes (100) préconisent le lavage des hématies, dans le but d'éliminer l'influence de l'anticoagulant et celle des constituants plasmatiques ; cette méthode est également utilisée par Daland et Worthley (1935 [30]), Ponder (1948 [72]), Maier (1950 [62]).

Wiseman et Bierbaum (1932 [103]) se servent d'hématies non lavées en suspension dans leur plasma, dans le but de maintenir un pH constant.

Les méthodes indirectes, par mesure de pourcentage d'hémoglobine dissoute, ont été utilisées par un grand nombre d'auteurs, parmi lesquels Mosso (1887 [66]), Viola (1902 [98]), Widal,

Abrami et Brulé (1907 [101]), Ashby (1924 [4]), Wiseman et Bierbaum (1932 [103]), Lepeschkin (1932 [60]), Diacono (1934 [33]), Daland et Worthley (1935 [30]), Creed (1938 [27]), Dacie et Vaugham (1938 [29]), Hunter (1940 [55]), Beer (1945 [8]), Parfart (1946 [67]), Hendry (1947 [53]), Sufss et coll. (1948 [93]), Brugsch et Hess (1948 [17], Bolton (1949 [13]), Jouly (1951 [58]), Sjolin (1954 [89]), Sachetta (1954 [83]), ont effectué les travaux les plus marquants.

D'autres emploient une méthode qui associe la numération des globules rouges non hémolysés et la détermination du taux de l'hémoglobine libérée : Waugh et Chase (1928 [99]), Gallo et Tolentino (1949 [40]), Zade-Open (1953 [106]).

En fait, toutes ces méthodes reposent sur le même principe mais chacune apporte des modifications aux différents facteurs qui pourraient influencer les systèmes hémolytiques (T°, pH, etc...).

Le mode de détermination de globules rouges hémolysées diffère également d'u nauteur à l'autre, ainsi que l'expression des résultats et leur représentation graphique.

II. — Exposé des résultats.

1. — *Principe et définition :*

La résistance osmotique de l'hématie se définit vis-à-vis des solutions salées hypotoniques de concentrations décroissantes. Cette résistance s'exprime en raison inverse de la fragilité des érythrocytes. Celle-ci augmente lorsque l'hémolyse se produit dans des solutions les plus concentrées et diminue lorsque les hématies supportent l'action de solutions de plus en plus diluées.

Mais l'expression générale de cette propriété conduit seulement à conclure à l'augmentation ou à la diminution de la fragilité globulaire sans tenir compte des modalités de l'hémolyse propre à chaque individu.

C'est pour cela que de nombreuses méthodes ont été utilisées par divers auteurs pour essayer d'éliminer les causes d'erreurs et pour tirer d'un examen standardisé le plus grand parti possible du point de vue clinique. La diminution de la résistance globulaire osmotique à des solutions salées hypotoniques de concentrations relativement élevées a été longtemps considérée comme un test pathognomonique d'ictère hémolytique de cause globulaire. Mais du fait qu'interviennent un certain nombre de facteurs, soit cellulaires, soit extracellulaires, l'interprétation de cet examen est rendue beaucoup plus délicate.

Actuellement on étudie surtout la durée de vie des hématies soit après marquage radio-actif, soit par la méthode d'Ashby. Mais ces procédés qui permettent d'estimer avec précision la longévité des érythrocytes n'apportent aucun élément d'appréciation sur la nature et les conditions de l'hémolyse ; ce que la mesure de la résistance globulaire osmotique, étudiant la fragilité de l'hématie, permet de mieux comprendre.

Mais on a coutume d'indiquer seulement les concentrations salines correspondant au début (hémolyse initiale) et à la fin (hémolyse totale) de l'hémolyse. Les auteurs anglo-saxons utilisent plutôt la fragilité globulaire moyenne (mean corpuscular fragility ou « M.C.F. ») qui indique le 50 % d'hémolyse. Mais ce mode d'expression a tendance à juger des hématies dont l'homogénéité est considérée comme évidente. Par expérience, nous considérons que cette notion est erronée.

2. — *Etude comparée des valeurs normales chez l'adulte, l'enfant et le nouveau-né :*

Les valeurs normales de la résistance osmotique des globules rouges de l'adulte sont :

- hémolyse initiale entre 0,54 et 0,48 % de Cl Na ;
- hémolyse totale entre 0,42 et 0,36 %.

Celles de l'enfant et du nourrisson sont :

- hémolyse initiale entre 0,58 et 0,50 % ;
- hémolyse totale entre 0,38 et 0,30 %.

Mais les traités ne fournissent pas de renseignements sur les valeurs normales de la résistance osmotique des hématies du nouveau-né.

Dacie et Vaughan (1938 [29]), au lieu de s'en référer aux notions d'hémolyse initiale et d'hémolyse totale, calculent la « M C F » qui correspond à la concentration saline qui donne le 50 % d'hémolyse. Pour 26 hommes adultes normaux, ils obtiennent une valeur de 0,366 et pour 24 femmes, la moyenne est de 0,365. Les auteurs ne trouvent pas de différence entre les valeurs de la résistance globulaire des deux sexes, contrairement à l'opinion de Leak et Pratt (59).

Guest (47), de 1939 à 1943, fait des études comparatives chez l'adulte, l'enfant et le nouveau-né : les globules rouges de l'adulte, de l'enfant et du nouveau-né se comportent comme des osmomètres parfaits. Ils acquièrent un volume maximum de 170 à 175 % du volume initial pour une concentration en Cl Na égale à 0,425 %.

Mais le volume globulaire maximum des macrocytes du nouveau-né atteint 165 % du volume initial dans des solutions de plus fortes tonicités. Donc chez le nouveau-né, l'hémolyse initiale, qui suit de très près le gonflement maximum des cellules, débute à des concentrations salines plus fortes que chez l'adulte et l'enfant.

En 1929, Goldbloom et Gottlieb (44) examinent des sangs de nouveau-nés et établissent que leurs hématies sont plus fragiles que celles d'un adulte. Ils utilisent des sangs de cordon immédiatement après la délivrance mais prélèvent sur solution de citrate de soude, ce qui semble déterminer une hémolyse spontanée considérable. Whitby et Hynes (100) trouvent plus de 20 % d'hémolyse spontanée sur un échantillon de sang prélevé de cette façon.

Une étude de la fragilité globulaire faite chez 10 enfants dans les vingt heures suivant leur naissance (prélèvement effectué au talon) montre que l'hémolyse débute dans une solution légèrement plus concentrée que chez l'adulte. Par contre, dans les solutions plus diluées, l'hémolyse est moins complète.

Goldbloom et Gottlieb (44) supposent alors que cette fragilité augmentée serait due aux réticulocytes présents dans le sang de l'enfant nouveau-né.

En 1956, une série d'expériences faites par O. Azzopardi (5) sur la réticulocytose expérimentale et la résistance globulaire osmotique va à l'encontre de cette hypothèse :

Des injections d'extraits ante-hypophysaires déterminent, chez le lapin, une augmentation du taux réticulocytaire. L'auteur a observé, à la suite de ces injections :

— une hypoglobulie et une réticulocytose puis le chiffre des globules rouges et des réticulocytes revient à la normale ;

— une bande d'hémolyse osmotique élargie, à la fois vers les solutions les plus concentrées et vers les moins concentrées en Cl Na.

A partir du quatrième jour, la résistance globulaire redevient normale pour les hématies les plus résistantes, mais le taux de chlorure de sodium qui correspond à l'hémolyse initiale demeure élevé.

Donc, d'après cette étude, les réticulocytes présentent une résistance accrue aux solutions hypotoniques.

Sjolin (1954 [89]) a obtenu des chiffres comparatifs chez le fœtus, le nouveau-né, l'enfant et l'adulte. Les chiffres d'hémolyses initiale et totale des sangs de cordon et d'adulte sont sensiblement les mêmes, mais d'après cet auteur, le fait que la bande d'hémolyse est plus étalée pour le sang de cordon, vient d'un nombre plus grand de globules hyper-résistants.

C'est durant les premiers jours de la vie et à la fin de la premières année que SJOLIN trouve une plus grande quantité de globules résistants (voir tableau 1 ci-dessous).

Ages	H 10 % % Na Cl	H 50 % % Na Cl	H 90 % % Na Cl
Fœtus	0,700	0,584	0,424
Sangs de cordon	0,588	0,496	0,366
12-48 heures	0,552	0,446	0,322
6- 8 jours	0,568	0,468	0,354
15- 45 jours	0,550	0,471	0,382
45- 75 jours	0,548	0,466	0,376
76-104 jours	0,548	0,469	0,386
4- 6 mois	0,548	0,469	0,386
10- 12 mois	0,526	0,477	0,396
7- 11 ans	0,532	0,465	0,398
Adultes	0,572	0,504	0,438

TABLEAU 1 : La résistance osmotique des globules rouges chez le fœtus, enfants et adultes. Valeurs moyennes des hémolyses de 10 %, 50 %, 90 % d'après SJOLIN - 1954 [89]).

3° FACTEURS INFLUENÇANT LA RÉSISTANCE GLOBULAIRE OSMOTIQUE.

A) FACTEURS CELLULAIRES

a) **La forme du globule rouge**

1. — *A l'état physiologique :*

La forme et le volume initiaux de l'érythrocyte jouent un rôle important dans son comportement, lors de l'hémolyse osmotique. PONDER et SASLOW (78) en 1931 croient qu'au début les globules rouges accroissent leur volume par passage d'eau et échanges ioniques sans extension réelle de la membrane cellulaire et sans changement de diamètre en raison d'une éversion partielle des concavités des cellules. Dans un milieu suffisamment hypotonique, une augmentation intérieure du contenu en eau est

associée à une extension de la membrane cellulaire et à une diminution du diamètre cellulaire (Ponder, 1922, 1923, 1933 [72], Ponder et Millon, 1925 [72]).

Avant l'hémolyse réelle, la cellule prend une forme plus sphérique, le degré initial de sphérocytose est donc très important pour déterminer à quelle concentration il y aura hémolyse. Si donc on considère que la membrane cellulaire est inextensible, on peut admettre que le volume auquel se produira l'hémolyse est celui d'une sphère ayant la même surface que l'érythrocyte dans sa forme initiale (Castle et Daland, Ponder [22]).

D'après Guest (1948 [47]), le gonflement maximum habituellement obtenu est de 175 % du volume initial, rigoureusement défini par la surface moyenne initiale.

D'après Cazal (22), un érythrocyte humain, d'un volume de 94 μ^3, n'aurait, s'il était sphérique, qu'une surface de 100 μ^2 alors que sa surface est de 163 μ^2, soit 63 μ^2 de plus.

Un tel globule peut être gonflé jusqu'à ce qu'il ait atteint le volume d'une sphère de 163 μ^2 de surface, soit 196 μ^3. Il peut donc doubler de volume, sans être hémolysé et des globules de même surface ont une résistance hypotonique d'autant plus forte que leur volume initial est plus petit, c'est-à-dire qu'ils sont initialement plus aplatis.

Dimensions des érythrocytes normaux :

On suppose un globule normal dont le diamètre moyen est de 8,5 μ, oscillant entre 8,2 et 8,9 μ et dont l'épaisseur varie de 2,4 à 1 μ. On déduit sa surface qui, pour Ponder, serait d'une valeur moyenne de 163 μ^2. Le volume globulaire moyen est de 88 μ^3, mais ce chiffre est très variable selon les méthodes employées. Ponder (72) donne un tableau récapitulatif des variations (*tableau* 2).

Méthode	*Cause d'erreur*	*Volume* (μ^3)
Colorimètre	il est possible que le colorant pénètre dans les interstices de l'ultrastructure globulaire, les incertitudes sont de l'ordre de 20 %	87
Hématocrite	incertitude due à la vitesse et à la durée de centrifugation. Possibilité de compression par les très hautes vitesses de rotation	82
Conductivité	incertitude découlant du facteur de forme et des effets de turbulence	89
Diffraction	difficulté de la définition de la position exacte du maximum et du minimum	82 à 94
	Incertitude dans l'explication théorique du phénomène	
Photographie	incertitude sur la position du bord de la cellule examinée entre lame et lamelle et sous forme sphérique	82 à 94

TABLEAU 2

D'après CAZAL (22), pour un globule normal dont le volume est égal à 94 μ^3 et la surface à 163 μ^2, W étant la teneur initiale du globule en eau et R le coefficient de correction, on peut écrire :

$$T_h = \frac{700\ F}{1081 + 700\ R}$$

Ce qui permet de calculer T_h, tonicité de la solution donnant l'hémolyse, pour différentes valeurs de R. (0,393 pour $R = 1$; 0,244 pour $R = 0,5$).

A l'état normal, la résistance globulaire moyenne, mesurée sur du sang prélevé ou défibriné, correspond à une concentration de 0,40 % de Cl Na. Sur du sang oxalaté, les chiffres normaux sont plus bas, car le coefficient R est plus faible. On obtient dans l'ensemble des chiffres un peu inférieurs à ceux prévus par la théorie.

D'après Ponder (72), l'accroissement du volume érythrocytaire jusqu'au « volume critique », ou pré-hémolytique, se réalise sans traumatisme de la surface globulaire.

L'importance de la forme et surtout du volume initial de l'hématie se retrouve au point de vue pathologique.

2) *Variations pathologiques de la forme de l'érythrocyte*

Il peut exister, d'après Cazal (22), deux sortes de variations :

— d'une part des variations de forme de la membrane globulaire sans modification de sa surface. L'indice de sphéricité est modifié, la surface demeurant normale : ce sont la sphérocytose et la platycytose. Dans la sphérocytose, l'indice de sphéricité s'élève, le diamètre diminue, l'épaisseur et le volume augmentent. Dans la platycytose, les modifications sont en sens inverse ;

— d'autre part, des variations de taille : la surface est anormale ; dans la macrocytose, toutes les dimensions s'accroissent, diamètre, épaisseur, volume, surface ; dans la microcytose, elles diminuent ; dans ces deux cas l'indice de sphéricité demeure normal.

Il peut exister des variations mixtes, la plus fréquente est la microcytose avec platycytose, qui se rencontrent dans les anémies ferriprives.

D'après les travaux de Guest (1948 [47]), les globules rouges de l'ictère hémolytique congénital ont un comportement

La forme du globule rouge peut être modifiée non seulement dans des conditions pathologiques, mais également dans des conditions expérimentales.

3) Variations expérimentales de la forme des érythrocytes :

d'autant plus d'eau, avant rupture osmotique que la saturation en hémoglobine est moins importante.

Dans des circonstances très diverses, l'hématie peut perdre sa forme biconcave pour devenir sphérique.

L'étude de ce phénomène permet de mettre en évidence l'intervention de divers facteurs extrinsèques influençant la forme et le volume de l'érythrocyte. La cellule n'est pas beaucoup altérée au cours de ces transformations qui sont en effet réversibles tant qu'il n'y a pas eu lyse.

Crénation — Sphération

La transformation de l'hématie en sphère étant très importante dans le mécanisme des processus hémolytiques, elle a fait l'objet de nombreuses études. Déjà Hamburger (50) en 1895 constate qu'après séjour dans des solutions salées ou sucrées isotoniques, les globules rouge de mammifères prennent une forme sphérique, souvent hérissée de piquants : c'est la forme en oursin (échinulations).

Ce phénomène ne se produit pas dans le sérum ou le plasma, Jolly signale que la forme épineuse peut disparaître spontanément et sous diverses influences.

D'après les observations de Gouch (1924 [46]), Furghgott et Ponder (39), on peut décrire trois phases :

— La surface de l'érythrocyte normal devient crénelée du fait de l'apparition de fines échinulations : c'est le phénomène de crénation. Ponder en a distingué deux types :

- la première sorte d'érythrocytes en oursin est due à la disparition du facteur anti-sphérocytaire. La surface de l'hématie présente de très fines dentelures, nombreuses et parfois filamenteuses, pouvant se briser et se disperser dans le milieu ;

- la seconde sorte de sphérocytes crénelés est due à une cristallisation de l'hémoglobine. Elle se produit dans le sang oxalaté, dans le sang citraté à froid et peut aboutir à la formation

d'un microcristal visible surtout dans certaines hémoglobinopathies (Hb C en particulier).

— Le disque crénelé se gonfle pour devenir une sphère crénelée, puis la sphère crénelée se transforme en sphère lisse et ce stade est prélytique. Tant qu'il n'y a pas eu lyse de la cellule, la sphération est réversible.

α — *Substances sphérantes :*

Il existe deux groupes d'agents sphérocyto-formateurs :

a) Après lavages dans des solutions isotoniques (Cl Na, IK, K Ce) on obtient une sphération très rapide avec le groupe Lécithine : céphaline, détergents anioniques et colorants fluorescéïques.

b) Le groupe saponine, céphaline et savons donne une sphération plus lente.

L'hématie peut reprendre une forme discoïdale soit par un lavage minutieux, soit par adjonction au milieu de substances anti-sphérantes :

— La benzine et le chloroforme ont une affinité pour la substance sphérante et en débarrassent l'hématie.

— Le plasma normal, l'albumine, le glucose et la gélatine.

Le tableau suivant (3), emprunté à Bessis et Bricka (1950 [12]), résume les constatations faites par ces auteurs sur les substances qui rendent à l'hématie sa forme de disque, lorsque celle-ci a été transformée en oursin après trois lavages dans le sérum physiologique.

TABLEAU 3

Donnent des sphérocytes ou des hématies en oursins	*Redonnent une forme normale aux hématies en oursin en sérum salé*
Lavage au Na Cl isotonique	Plasma normal : 1/8 à 1/64
I K »	Albumine : 1/800
K Cl »	Glucose : 25/1 000
Traces de lécithine	Gélatine : 1/100
Traces de cholalate	Chl. de quinine : 5/1 000
Chauffage 50° et 37°	p H : 3,8 à 4,5 (citrate acide de Wurmser)
Vieillissement en glacière (3 à 15 jours)	Phénergan : 1/20 000
Alcool 10 %	
p H 8-9 (bicarbonate)	(HALPERN et BESSIS)

Après plusieurs heures entre lame et lamelle, les hématies semblent reprendre d'elles-mêmes leur forme discoïde dans le sérum physiologique. Les formes discoïdes sont cependant plus plastiques, montrant parfois l'aspect classiquement dénommé « en cupule » (BESSIS et BRICCA (1960 [12]).

Il est des cas où la forme sphérocytique paraît irréversible : un sang conservé de six jours, dont les globules sont en oursins, n'est pas modifié par adjonction d'albumine ou de plasma ; mais après lavage physiologique et adjonction d'albumine, on peut obtenir à nouveau la forme normale. Des sphérocytes en oursins, dans une solution physiologique à laquelle on a ajouté de l'éosine, sont insensibles à l'action de substances antisphériques, ils redeviennent sensibles à cette action si on les lave à nouveau pour éliminer l'éosine.

— « *L'Antisphering Protein* » :

Normalement, les hématies gardent leur forme biconcave dans une large gamme de p H du milieu et ne deviennent sphériques qu'au-dessus du pH : 11,3 ; FURGHGOTT et PONDER (1940

[39]) et Ponder (1948 [72]) démontrent qu'une albumine plasmatique est responsable de l'action antisphérocytaire et du maintien de la forme biconcave de la cellule. La quantité de protéines détachable de la surface de l'érythrocyte forme autour de la cellule une couche continue d'une épaisseur de 50 A.

Dépourvues de cette protéine, les hématies perdent leur biconcavité à un pH de 9,2 mais son adjonction dans le milieu rétablit la forme normale.

Pour Abramson et coll. (1942 [1]), cette substance ne formerait pas une couche superficielle sur la surface du globule puisque, en éliminant l'albumine, on ne change pas la vitesse des hématies dans un champ électrique.

Steinbuch (1954 [92]) étudie l'intéraction albumine-globule rouge. Il prépare une série d'albumines dénaturées (par la chaleur, urée ou guanidine) et modifiées (albumines acétylées, toxylées, formolées) puis évalue leur capacité d'absorption par rapport à certains colorants anioniques et leur action antisphérocytaire. Il démontre que les modifications qui diminuent la capacité d'absorption pour les anions suppriment l'action antisphérocytaire et l'albumine sérique.

Quoi qu'il en soit, les substances sphérantes agissent en se combinant aux molécules de cette albumine : des érythrocytes en suspension salée, mis entre lame et lamelle, prennent la forme en oursins. Ponder en déduit que les surfaces de verre ont une action sphérante par adsorption de l'albumine. Cette transformation est facilitée par l'élévation de pH plasmatique, dans ces conditions, de 7 à 9, ce qui explique qu'on n'obtienne pas ce phénomène en utilisant des surfaces de quartz ou de parafine. Cette albumine serait associée assez intimement au stroma, car plusieurs lavages sont nécessaires pour obtenir que tous les globules se transforment en oursins (Bessis et Bricka [12]). Si on combine l'action des produits antisphériques avec une variation de la concentration du milieu salin, l'effet est spéci-

fiquement le même, mais la forme des hématies varie. Si, sur des formes épineuses, on fait agir du sérum hypertonique, ces formes se contractent encore davantage. Si l'on fait agir du sérum hypotonique, elles s'arrondissent et les épines disparaissent. Mais si on fait agir ces sérums en présence d'une substance antisphérique, dans le premier cas, les hématies prennent l'aspect d'une galette très aplatie, dans le deuxième cas, toutes les hématies ou presque prennent la forme en cupule que l'on peut observer occasionnellement dans le sang normal ou légèrement altéré. Toutes ces images s'observent aussi bien sur des globules rouges remplis d'hémoglobine que sur les stromas globulaires dépourvus d'hémoglobine.

β — *Actions d'autres facteurs expérimentaux sur la forme des hématies :*

1) *Oxygénation des hématies :* Hamburger (50) en 1887, constate que le volume érythrocytaire augmente, donc que la résistance globulaire diminue, lors de la fixation de CO_2.

Selon Van Slyke et Mac Lean (1923 [95]), avec une pression du CO_2 passant de 41,6 à 49,2 mm de mercure, on obtient une augmentation de 0,4 % du volume cellulaire. D'après Doisy et Eaton (1921 [34]), le volume globulaire augmente de 2,6 % lorsque la pression de CO_2 passe de 23 à 760 mm de mercure.

Pour Hendry (1954 [53]), l'oxygénation présente un intérêt certain dans la détermination des volumes cellulaires, mais ne joue qu'un rôle négligeable dans celle de la résistance osmotique, d'autant plus que l'expérimentation se fait avec des solutions salines en équilibre avec l'air ambiant et que l'hémoglobine, au moment de l'examen, s'y trouve presque entièrement à l'état oxygéné.

2) *Action du pH de la solution hémolytique :*

D'après Hampson et Maizels (1926-27 [51]), le volume

de toute cellule en solution salée dépend de la concentration du sel et du pH de la solution. Le volume est minimum pour un pH de 8,1, il augmente pour un pH accru, ou diminue pour un pH abaissé.

Bessis (1954 [10]) observe que l'acidité du milieu a une action antisphérocytaire sur l'hématie, puis la transforme en annulocyte aux environs de 3,8 ; cet anneau tend à devenir triangulaire et, à un pH inférieur, l'érythrocyte prend une forme de haricot avec hile.

3) *Action de la température :*

Jacobs et Parpart (1931 [56]), Ponder (1934 [72]) constatent que, pour une température abaissée, l'hémolyse augmente.

De nombreux chercheurs se sont intéressés à ce problème, qui a une grande importance pour la conservation du sang. On sait que la survie d'hématies soumises à l'action de la congélation est possible dans certaines conditions, mais le mécanisme de ce phénomène n'a pas encore été expliqué d'une manière satisfaisante : pour certains, il y aurait formation de glace amorphe intracellulaire ; pour d'autres, il se produirait une deshydratation cellulaire.

b) **L'âge du globule rouge** :

Hamburger (50) et Viola (98) avaient déjà observé des variations de la résistance globulaire osmotique selon l'âge du globule. Prankerd (1961 [80]) établit une relation entre l'âge et l'épaisseur cellulaires, mais d'autres paramètres peuvent également intervenir. En regard avec l'âge, la séparation des cellules par centrifugation révèle que les plus jeunes, ou les moins denses, sont les plus résistantes à la lyse osmotique, tandis qu'on trouve l'inverse avec les plus vieilles et plus denses. Mais la relation qui existe entre la résistance osmotique d'un globule et son âge est encore inconnue.

Pour Sjolin (1954 [89]), il n'existe pas de relation continue et régulière entre ces deux caractères, mais la résistance globulaire des hématies mûres, nouvellement formées est abaissée durant les trois ou quatre premiers jours, tandis que les réticulocytes et les globules très vieux semblent être plus résistants que l'ensemble des érythrocytes.

B) Facteurs extra-cellulaires :

LES MODIFICATIONS PHYSICO-CHIMIQUES DU SANG

1. *Influence du pH :*

Tout état alcalosique du sang entraîne une augmentation de la résistance globulaire osmotique. De nombreux travaux dont ceux de Butler (1912-1913 [18]), Creed (1938 [27]), Whitby et Hynes (1935 [100]), Ponder (72), Sjolin (89), ont montré que les globules rouges du sang veineux avaient une résistance globulaire diminuée par rapport à celle des hématies du sang artériel. En effet, les variations de pH entraînent des modifications du volume globulaire et interviennent donc directement dans l'hémolyse et la fragilité globulaire.

2. *Influence des lipides, du cholestérol et des phosphatides :*

On sait depuis longtemps que le cholestérol a un pouvoir protecteur vis-à-vis de l'hématie, tandis que la lécithine favorise l'hémolyse. Il existe deux rapports importants pour leur relation avec l'hémolyse osmotique.

Le premier, mis en évidence par Mayer et Schaeffer (64) est le rapport cholestérol/acides gras, qui conditionne la faculté d'imbibition des colloïdes globulaires.

Le second, pour Viale (97), est le rapport lécithine-cholestérol, qui règle également l'état d'imbibition du globule et sa perméabilisation aux ions.

D'autres facteurs entrent en jeu au cours de l'hémolyse. Ainsi toutes les substances capables d'augmenter la résistance capillaire ont une action sur l'hémolyse.

Chapitre III

TRAVAUX PERSONNELS

I. — TECHNIQUE UTILISEE DANS CE TRAVAIL

Principe :

La technique de détermination de la résistance globulaire osmotique aux solutions hypotoniques que nous avons employées est celle de Diacono (H et G) (1953 [31]). Par un procédé ingénieux de distribution, on réalise avec précision et simplicité, des séries de solutions salines de concentration décroissante. La quantité d'hématies mise en présence de ces solutions est toujours la même.

Le taux d'hémoglobine libérée est lue au photocolorimètre ou au spectrocolorimètre, ce qui permet de construire une courbe d'hémolyse, en fonction de la concentration saline. On en déduit une expression différentielle dont le graphique indique le nombre de populations d'hématies suivant leur résistance, dans l'échantillon de sang examiné.

Matériel :

— Douze tubes à hémolyse de 13 mm sur 60 mm.

— Deux petits béchers.

— Un rhéomètre de Vernes jaugé à 2 ml.

— Un compte goutte de Duclaux.

— Solution de chlorure de sodium à 9 ‰ préparée avec soin. Le titre de la solution est vérifié avec du Cl Na fondu, dont le caractère anhydre a été confirmé par passage à l'étuve à

100°, au photomètre à flamme, elle doit renfermer 156 m Eq/litre de Na.

— De l'eau fraîchement bidistillée.

Le sang examiné est recueilli sur héparine dans la proportion de 1 mgr d'anticoagulant en solution pour 10 ml de sang. On peut également obtenir une quantité suffisante d'hématies à partir d'un caillot.

Notre étude porte sur 200 échantillons de sang de cordon, prélevés soit à la clinique obstétricale de l'hôpital de la Grave, soit dans les cliniques de la ville.

Transmis dans les heures suivant la naissance, ces sangs ont pu être examinés rapidement. Les prélèvements remontant à plus de 24 heures sont considérés comme impropres à l'examen car ils présentent une hémolyse importante.

Technique :

Le lavage des hématies n'étant pas jugé indispensable, on opère sur le culot globulaire ou sur le sang total :

1) On introduit dans chaque tube une goutte de purée globulaire ou de sang total mesurée à la pipette calibrée, donnant l'assurance d'un volume constant de sang et d'hématies et permettant une lecture spectophotométrique comparative.

2) On verse dans un des petits bêchers (A) 20 ml de solution de Na Cl 9 ‰ ou dix fois le volume de la cylindrée du rhéomètre. On garnit l'autre bêcher (B) d'eau bidistillée.

3) La distribution des solutions hypotoniques se fait à l'aide du rhéomètre de Vernes, de telle sorte que les taux de concentration de Cl Na réalisés dans chaque tube soient en progression géométrique :

On porte dans le vase une cylindrée du rhéomètre que l'on verse dans le premier tube, puis, au moyen du même rhéo-

mètre, on prélève, dans le vase B, 2 cc d'eau bidistillée que l'on porte dans le vase A, en remplacement de la cylindrée initiale de solution chlorurée à 9 ‰ que l'on a introduit dans le premier tube. On brasse en manœuvrant le piston du rhéomètre sans sortir l'aiguille du liquide. On en prélève une cylindrée, que l'on porte dans le deuxième tube.

On recharge le rhéomètre avec de l'eau bidistillée, on introduit ces 2 ml d'eau bidistillée dans le vase A, on brasse et porte une cylindrée de cette solution dans le troisième tube, etc...

On réalise ainsi, sous un volume constant de 2 ml, une série de dilutions géométriques dont la raison est 0,9, ce qui revient à dire que chaque tube contient les $9/10^{e}$ de la quantité de Cl Na contenue dans le tube précédent. On peut aussi, pour sensibiliser la méthode, faire la répartition en 36 ou 48 tubes, suivant la raison géométrique 0,95. Pour cela, il faut introduire un volume de 40 ml dans le vase A et opérer la distribution sous volume de 2 ml par tube suivant le mode décrit ci-dessus.

Tubes	*Concentration en* Na-Cl *pour* 100	
	raison 0,90	raison 0,95
1	0,9	0,9
2	0,81	0,855
3	0,73	0,812
4	0,656	0,771
5	0,59	0,732
6	0,53	0,695
7	0,478	0,660
8	0,43	0,627
9	0,387	0,595
10	0,348	0,565
11	0,313	0,536
12	0,282	0,509
13	0,254	0,483

14	0,229	0,438
15	0,206	0,435
16	0,186	0,413
17	0,167	0,392
18	0,150	0,372
19	0,136	0,353
20	0,122	0,335
21	0,110	0,318
22	0,099	0,302
23	0,089	0,287
24	0,80	0,272
25	0,072	0,258
26	0,065	0,245
27	0,058	0,233
28	0,053	0,221
29	0,048	0,210
30	0,043	0,199
31		0,189
32		0,179
33		0,170
34		0,162
35		0,154
36		0,146
37		0,131
38		0,118
39		0,113
40		0,106
41		0,1007
42		0,095
43		0,088
44		0,084
45		0,080
46		0,076

On agite les porte-tubes de manière à bien mélanger les hématies à la solution saline qui les renferme.

Lecture :

a) *Lecture macroscopique :*

Placer les portoirs sur une table bien éclairée et faire la lecture quand les hématies sont partiellement sédimentées.

— Hémolyse initiale : premier tube dans lequel le liquide, surnageant le voile constitué par les hématies partiellement sédimentées, est coloré (normale : 6e ou 7e tube).

— Hémolyse totale : premier tube où n'existe ni voile, ni dépôt d'hématies et où le liquide rouge est parfaitement transparent (normale 9e ou 10e tube).

b) *Evaluation électrophotométrique du degré d'hémolyse :*

Les tubes laissés à la température du laboratoire pendant dix minutes, sont ensuite centrifugés à 2 600 tours/minute pendant cinq minutes. Le degré d'hémolyse des liquides surnageant est évalué au colorimètre ou au spectocolorimètre (filtre 540) en prenant comme blanc (100 % de transmission ou Do = o) d'un tube où les hématies n'ont pas été hémolysées c'est-à-dire le tube renfermant la solution isotonique ; le 100 pour cent d'hémolyse représente le degré d'hémolyse obtenue dans l'eau bidistillée pure.

Interprétation graphique des résultats :

On construit la courbe de variations de l'hémolyse, en portant en abcisse les concentrations de Cl Na et en ordonnées le pourcentage d'hémolyse déduit des chiffres donnés par la lecture photométrique.

On peut en déduire la résistance minima (hi = hémolyse initiale) et la résistance maxima (Ht = hémolyse totale). Nous préférons utiliser les chiffres d'hémolyse à 5 % et 100 %, nous déterminons également le 50 % d'hémolyse ou M.C.F.

On construit alors l'expression différentielle de la courbe de variation de l'hémolyse : « on porte en abcisse la concentration en Na Cl, et en ordonnée l'augmentation relative du degré d'hémolyse par rapport à une diminution constante de concentration saline » (AZZOPARDI).

Intérêt de cette technique :

Nous avons retenu cette méthode, aujourd'hui classique, pour plusieurs raisons :

— La simplicité de son exécution permet de la mettre dans les mains les moins expertes. La distribution des solutions hypotoniques est réalisée d'un geste automatique, ce qui minimise les risques d'erreur. Il n'est pas nécessaire de préparer à l'avance des solutions salines de concentrations décroissantes, ce qui multiplierait les risques d'erreur. En partant d'une seule solution à 9 ‰ de Cl Na et en réalisant les dilutions selon la méthode indiquée, l'erreur devient minime ; au cours de cette étude, nous n'en avons pas relevé.

— La commodité de la réalisation d'une série de concentrations salines géométriquement décroissantes, de raison 0,9, permettant de se placer dans les conditions de calcul logarithmique.

— La reproductibilité de ses résultats.

— La perception immédiate de la concentration où l'hémolyse devient totale.

— La possibilité aisée d'une lecture photométrique pour laquelle nous avons respecté des conditions telles que la constance du volume sanguin soumis à l'hémolyse et l'invariabilité du volume total de solution saline. Ceci facilite l'établissement d'une courbe qui permet une lecture plus approfondie du phénomène hémolytique.

Les éléments entrant dans la réaction ont été différemment modifiés par de nombreux auteurs, mais, en définitive, les variations de préparation des hématies, leur lavage, l'utilisation de la température du laboratoire ou de l'étuve à 37° C, ne modifient pas qualitativement et quantitativement les résultats à la condition de respecter les impératifs techniques que nous venons d'énumérer.

II. — EXPRESSIONS DES RESULTATS

Pour chaque échantillon de sang de cordon soumis au test de Diacono, on construit la courbe de variation de l'hémolyse, en portant en abcisse les concentrations décroissantes de Na Cl, et en ordonnée, l'intensité de l'hémolyse en densité optique.

Sur la courbe ainsi obtenue, on détermine :

— Le 5 % d'hémolyse qui correspond au début de l'hémolyse franche, décelable par la libération de 5 % d'hémoglobine des globules rouges : c'est la résistance globulaire minima.

— Le 100 % d'hémolyse : c'est la fin du processus hémolytique, le moment où *toute*s les hématies soumises au test ont été détruites, libérant la totalité de leur hémoglobine, comme le ferait la même quantité d'érythocytes, sous l'action d'eau distillée. Cette valeur représente la limite maxima de la résistance globulaire.

— Le 50 % d'hémolyse ou fragilité moyenne des globules rouges : c'est la valeur de la solution saline hypotonique où 50 % des hématies sont détruites, ou bien, où 50 % d'hémoglobine totale se trouve libérée.

Résultats :

Nous considérons que, chez le nouveau-né normal, les érythocytes commencent à hémolyser entre 0,68 et 0,54 % et sont totalement détruits dans des solutions titrant entre 0,35 et 0,30 g/% de Cl Ha.

La fragilité moyenne des érythrocytes se situe vers 0,47 %.

Tout en restant dans les limites de la normale, les valeurs de la résistance globulaire du nouveau-né sont très étalées et beaucoup plus variables que celles de l'enfant et l'adulte. Les hématies d'adulte normal présentent une hémolyse à 5 % dans des solutions titrant 0,54 à 0,48 % de chlorure de Sodium, tandis que l'hémolyse à 100 % se produit dans des solutions de 0,36 à 0,42 %. Pour l'enfant et le nourrisson, ces valeurs sont de 0,58 à 0,50 % de Na Cl et de 0,38 à 0,30 %.

Analyse des éléments graphiques :

1. — *Notion de population d'hématies* (tableau 4) :

Tableau 4

	Résistance globulaire normale, comprise entre 0,68-0,30 % (H 5 %-H 100 %)	*Résistance globulaire augmentée, comprise entre* 0,50-0,28 % (H 5 %-H 100 %)	*Résistance globulaire diminuée, comprise entre* 0,70-0,35 % (H 5 %-H 100 %)
Courbes obtenues	94	57	49
Pourcentage	47 %	28,5 %	24,5 %
1 population d'hématies	45	15	12
2 population d'hématies	35	26	24
3 population d'hématies	10	15	8
4 population d'hématies	3	1	4
5 population d'hématies	0	0	1

Tableau des résultats obtenus sur 200 échantillons de sang de cordon.

Lorsqu'on construit l'expression différentielle de la courbe d'hémolyse obtenue avec du sang d'adulte, d'enfant ou de nourrisson normaux, on obtient une courbe de Gauss unique. Toutes ou presque toutes les hématies de ces sujets présentent la même fragilité osmotique ou la même résistance aux solutions salines hypotoniques. L'expression graphique indique que la population érythrocytaire est homogène.

Il est rare d'obtenir chez le nouveau-né des résultats identiques à ceux de l'enfant et du nourrisson, dans la plupart des cas, l'analyse différentielle montre un, deux ou plusieurs segments graphiques, en forme de courbe de Gauss. Ceci met en évidence et affirme l'hétérogénéité de la population érythrocytaire. L'hémolyse ne se produit pas au même moment pour chaque groupe d'hématies. Il est alors facile de déterminer le pourcentage de globules hémolysés entre deux concentrations salines déterminées.

Cependant cette appréciation n'est pas aussi facile sur les courbes où les fractions ne sont pas nettement individualisées. La courbe différentielle est quelquefois étalée et aplatie. Il est alors difficile d'isoler les groupes d'hématies plus ou moins résistants et de parler de populations distinctes.

II. — *Les différents types de courbes :*

a) L'expression différentielle de la courbe d'hémolyse est une courbe de Gauss : l'échantillon de sang examiné ne contient qu'une population homogène d'hématies. Nous en avons isolé **73 cas**. Mais cette population peut être, soit :

● Normalement résistante et la courbe d'hémolyse est normale ou typique : **40, soit 54,9 %.** Le 50 % d'hémolyse se produit par une concentration moyenne de Cl Na égale à 0,5 % (*fig.* 2).

● Hyperrésistante (*fig.* 3) : **21, soit 28,7 %.** Le 50 % d'hémolyse se situe à une concentration saline inférieure à 0,40 %.

● Hyporésistante (*fig.* 4) : **9, soit 12,3 %.** Le 50 % d'hémolyse est à une valeur supérieure à 0,60 %.

● Etalée (*fig.* 5) : **3, soit 4,1 %.** L'hémolyse a 50 % est sensiblement égale à 0,5 %.

b) L'expression différentielle de la courbe d'hémolyse permet d'isoler plusieurs populations d'hématies : nous en avons individualisé : **127 cas.**

Le type le plus fréquent de courbe obtenue est une courbe d'hémolyse apparemment normale mais dont l'expression différentielle met en évidence des hématies se comportant différemment dans les solutions hypotoniques. La répartition de ces populations de globules rouges est équilibrée dans les zones d'hypo-normo et hyperrésistance, affectant le type de courbe d'hémolyse que Dacie a décrite sous le nom de courbe en diagonale :

— dans un premier cas, les érythrocytes d'un même sang sont normo, hyper ou hyporésistants, mais se répartissent de telle sorte que le 50 % d'hémolyse reste dans les limites normales (*fig.* 6) : **83, soit 65 %** ;

— ou bien les populations sont toutes hyperrésistantes (*fig.* 7) : **34, soit 26,8 %** ;

— ou bien les populations d'hématies sont hyporésistantes (*fig.* 8) : **10, soit 8,2 %.**

Il n'est pas possible, dans le cas de courbes différentielles multiples, d'attribuer d'importance au 50 % d'hémolyse pour la totalité des hématies. Il conviendrait plutôt de déterminer la fragilité corpusculaire moyenne de chaque population d'hématies en considérant le sommet de chaque courbe de Gauss, aussi

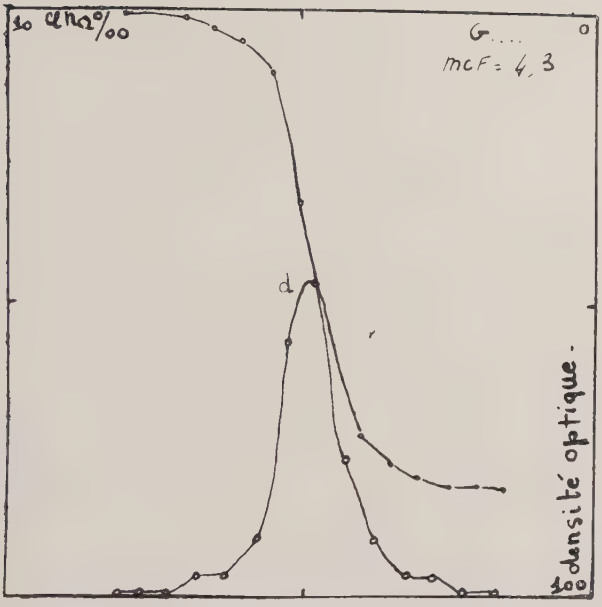

FIG. 2. — Courbe d'hémolyse normale,
l'expression différentielle (d) ne montre qu'une population d'hématies.

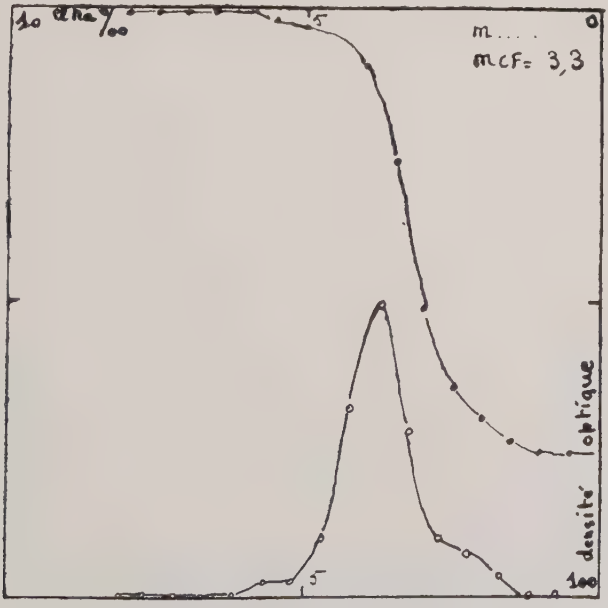

FIG. 3. — Courbe d'hémolyse en hyper.
L'expression différentielle montre une population d'hématies hyperrésistantes.

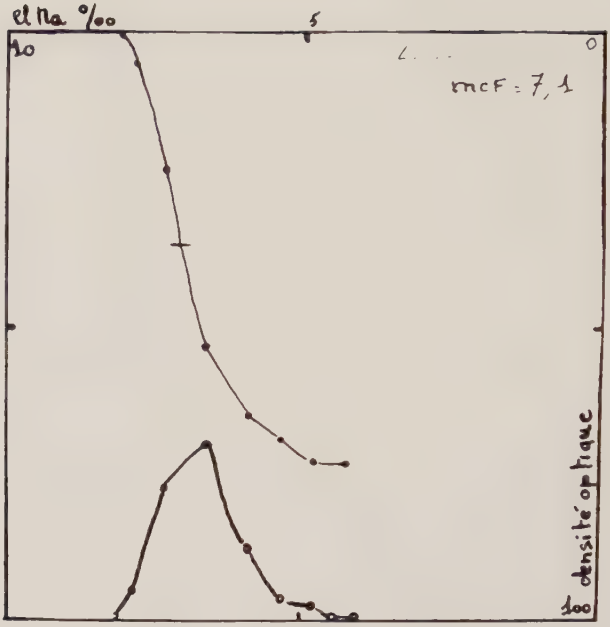

FIG. 4. — Courbe d'hémolyse en hypo.
L'expression différentielle montre une population d'hématies hyporésistantes.

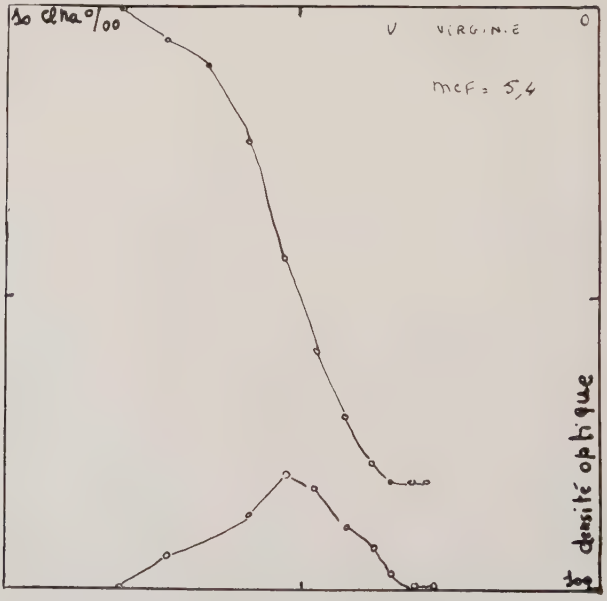

FIG. 5. — Courbe d'hémolyse subnormale.
L'expression différentielle montre une population étalée d'hématies.

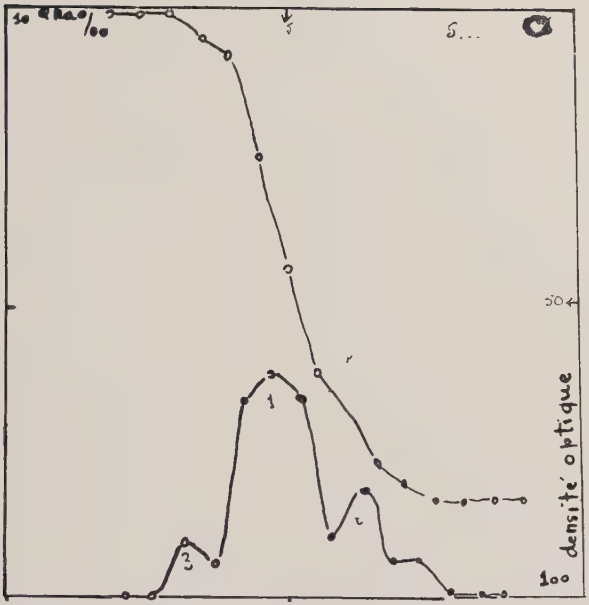

FIG. 6. — Courbe d'hémolyse normale.
L'expression différentielle montre 3 populations d'hématies normo (1), hyper (2) et hypo (3) résistantes.

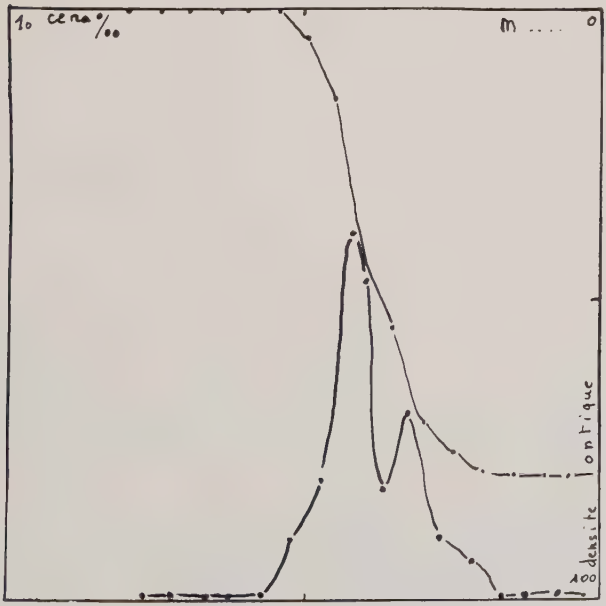

FIG. 7. — Courbe d'hémolyse en hyper.
L'expression différentielle montre 2 populations d'hématies hyperrésistantes.

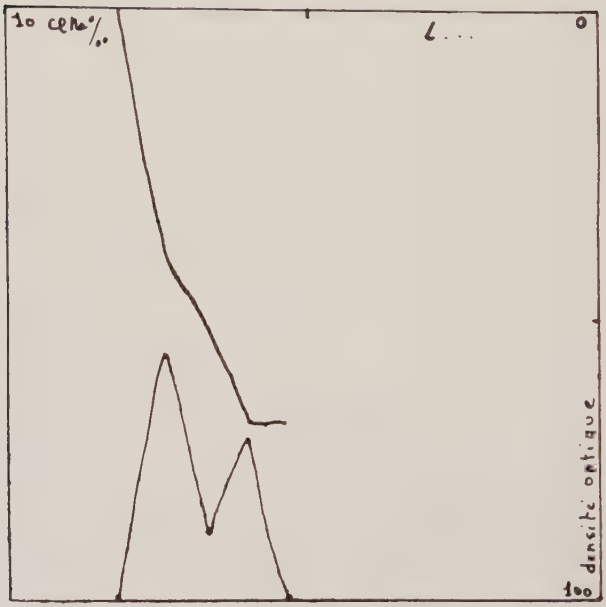

Fig. 8. — Courbe d'hémolyse en hypo.
L'expression différentielle montre 2 populations hyporésistantes.

bien que le pourcentage de chaque population ainsi déterminée. Cette façon de procéder paraît plus logique et plus conforme à la réalité puisqu'elle permet de tenir compte de l'aptitude hémolytique de chaque population d'hématies.

Pour nous résumer : dans le cas d'hématies normales d'adulte, d'enfant ou de nourrisson, la courbe de variation de l'hémolyse est une sigmoïde dont l'expression différentielle est une couche de Gauss. A l'inverse, pour presque tous les sangs de cordon examinés, nous avons obtenu des courbes de variation de l'hémolyse imprécises, non superposables aux courbes normales d'adulte, d'enfant ou de nourrisson.

L'expression différentielle fait apparaître des graphiques variables suivant les individus. Ainsi l'examen comparatif des courbes nous permet de constater que :

1° Fréquemment, la zone d'hémolyse est étirée, commençant plus tôt, elle se termine dans des solutions plus diluées en Cl Na.

2° Les irrégularités de la courbe permettent de penser que les phénomènes hémolytiques sont perturbés par rapport à la normale (étant bien entendu que nous considérons comme normale la courbe unique, strictement localisée des hématies d'enfant ou de nourrisson normaux).

3° L'expression différentielle de cette courbe est très différente de celle obtenue avec des sangs normaux, elles fait apparaître l'hétérogénéité de la population érythrocytaire du nouveau-né.

TABLEAU 5

Noms	*Globules rouges*	*Réticulocytes*	*Pourcentage Réticulocytes*	*Résistance globulaire* (1)	*Populations Hématies*	*Pourcentage populations hyperrésistantes*
Pas...	3 750 000	50 000	1,3	5,8 - 2,5	1	0
Req...	4 350 000	35 000	0,80	6,5 - 3,9	1	0
Buo...	5 700 000	65 000	1,14	5,5 - 3,1	1	0
Cah...	6 200 000	158 000	3,5	7,4 - 3,1	2	0
Ib...	5 300 000	22 000	0,41	6,8 - 3,5	1	0
Gr...	4 950 000	32 000	0,60	6,4 - 2,8	1	0
Se...	4 000 000	25 000	0,62	5,9 - 2,5	3	18 %
At...	5 000 000	25 000	0,52	7 - 2,1	2	51 %
Va...	4 350 000	35 000	0,80	6 - 2,9	2	60 %
Vit...	4 850 000	60 000	1,2	5,1 - 2	2	62 %
Cjia...	4 650 000	30 000	0,7	5 - 2,1	2	72 %
Roq...	5 100 000	100 000	1,9	5,6 - 2,8	2	81 %
Se...	1 550 000	90 000	50,8	6,2 - 2,8	1	100 %
Pe...	4 800 000	21 000	0,43	5,7 - 3,8	1	100 %
Ge...	3 750 000	8 000	0,21	4 - 1,9	1	100 %
Mo...	5 700 000	20 000	0,30	5,2 - 2	1	100 %
Ci...	4 850 000	15 000	0,30	5,5 - 2,8	1	100 %
De...	4 000 000	40 000	1	4,8 - 2,1	1	100 %

Le premier chiffre représente l'hémolyse à 5 %, le second l'hémolyse à 100 %.

III. — RESISTANCE GLOBULAIRE ET AUTRES CONSTANTES BIOLOGIQUES DU NOUVEAU-NE A L'ETAT NORMAL ET PATHOLOGIQUE

I. — Résistance globulaire et Réticulocytes :

On a souvent expliqué les variations de la fragilité globulaire par la présence en plus ou moins grand nombre des réticulocytes dans le sang des nouveau-nés. Il est admis que ces cellules présentent une résistance accrue aux solutions hypotoniques. Une augmentation ou une diminution de leur nombre dans le sang de cordon devrait donc amener des variations parallèles de la résistance globulaire.

Dans le tableau ci-contre (*tableau* 5), nous avons établi, pour chaque échantillon de sang, le pourcentage du taux de réticulocytes par rapport aux hématies puis celui de la population hyperrésistante par rapport aux autres populations de globules rouges présentes dans le sang examiné :

A l'examen du tableau ci-contre, nous voyons qu'il n'existe aucune corrélation entre le taux des Réticulocytes (valeur absolue et pourcentage par rapport aux globules rouges) ; le nombre de populations d'hématies et le pourcentage des hématies hyperrésistantes. D'après ces données, il semblerait que l'hyperrésistance des réticulocytes, classiquement admise, n'est pas l'apanage de ces cellules, mais qu'il existe dans le sang circulant, des érythrocytes dont la fragilité est moins grande que la normale pour des raisons difficiles à élucider, sur lesquelles aucun auteur ne s'est encore penché.

II. — Résistance globulaire et hémoglobine alcalino-résistante :

Devant les variations de la fragilité osmotique des hématies de sang de cordon, nous avons été conduite à nous demander

si la résistance globulaire de ces cellules n'était pas directement liée à la présence d'une proportion plus ou moins grande d'hémoglobine alcalinorésistante.

— *Protocole expérimental :*

La technique de Singer permet de différencier avec certitude l'hémoglobine fœtale des hémoglobines adultes ou pathologiques.

On part d'un hémoglobinat comme pour les épreuves d'électrophorèse. On reçoit dans un tube 1,6 cm^3 de réactif alcalin à la soude ou à la potasse, qu'on chauffe quelques minutes au bain-marie à 20°. On ajoute ensuite 0,1 cc d'hémoglobinat. On déclenche le chronomètre et après une minute exactement, on met dans le mélange le réactif précipitant (sulfate d'ammonium et acide chlorhydrique) qui arrête net le processus dénaturant. Après filtration, le liquide reste incolore avec l'hémoglobine adulte normale et les hémoglobines pathologiques, mais reste coloré en brun avec l'hémoglobine fœtale.

D'après le tableau ci-après (*tableau* 6), nous pouvons voir que le parallélisme peut, à quelques exceptions près, être considéré comme parfaitement établi entre la résistance à la dénaturation alcaline d'une part et le pourcentage de population d'hématies hyperrésistantes d'autre part. Ce qui revient à dire que la R.D.A. est d'autant plus élevée que les hématies sont moins fragiles, ou que les hématies du nouveau-né sont d'autant plus résistantes que la quantité d'hémoglobine fœtale qu'elle renferme est plus importante. Cette notion d'hyperrésistance d'hématies fœtales se trouve confirmée par les travaux de Betke et ses collaborateurs qui font le diagnostic des hématies renfermant de l'hémoglobine F après lavage dans un tampon déterminé favorisant la fuite de l'hémoglobine des hématies, dans lesquelles elle est de type adulte.

Agnisetta et Massenti (1953 [2]), ont essayé d'établir un rapport entre la quantité d'hémoglobine alcalino-résistante

TABLEAU 6

Noms	*R D A*	*R-G* H 5 % H 100 %	*Nombre de populations d'hématies*	*Pourcentage de population hyperrésistante*
Rey...	26 %	7,2 - 4,3	1	0
Min...	33 %	6,5 - 2,8	3	3 %
Gu...	35 %	5,2 - 3,1	2	32 %
Bu...	37,5 %	5,5 - 3,1	2	0
Du...	38 %	6,6 - 2	3	1 %
Ro...	39,5 %	5,6 - 2,8	2	0
De...	39,9 %	7,7 - 4,9	2	0
Es...	42 %	6,6 - 2,5	2	3 %
Ng...	44,5 %	7,8 - 2,8	5	40 %
Ma...	47,2 %	5,7 - 2,3	2	33 %
La...	52 %	6,7 - 2,8	3	28 %
Se...	67,5 %	5,9 - 2,5	3	17 %
Co...	77 %	6,6 - 2,5	2	72 %
Ha...	79 %	7,6 - 3,5	2	41 %
Vi...	80 %	5,5 - 2,5	3	94 %
At...	81 %	7 - 2,1	2	50 %
Ba...	81,5 %	6,3 - 1,9	2	65 %
Lla...	86 %	5,2 - 2,8	3	95 %
Co...	88 %	5,1 - 2,7	1	100 %
Gia...	95 %	5 - 2,1	2	100 %

des globules rouges thalassémiques et la diminution de la fragilité de ces hématies à la lyse osmotique. La notion de « valeur minute » par les hématies résistantes à l'hypotonie n'a pas de correspondance exacte avec la thalassémie dans l'aquelle l'étalement de la résistance globulaire est la cause d'une fragmentation de la population érythrocytaire.

BÉNARD, DANTCHEV et GAJDOS (1955 [9]) étudient les globules rouges de lapin, qui renferment normalement une forte proportion d'hémoglobine alcalino-résistante, pouvant atteindre

80 % du pigment total. Ils cherchent à établir une relation entre la résistance globulaire osmotique et l'inégale répartition des deux types d'hémoglobine. Ces auteurs réalisent plusieurs degrés d'hémolyse osmotique, compris entre 25 et 100 % ; ils trouvent le même taux d'hémoglobine alcalino-résistante dans les hématies des divers culots de centrifugation et, d'autre part, dans les hémolysats correspondants ; ils ne mettent pas en évidence des variétés d'hématies de teneur différente en hémoglobine alcalino-résistante, ce qui aurait pu expliquer une résistance osmotique inégale de ces hématies.

III. — Résistance globulaire et bilirubinémie chez le nouveau-né atteint d'ictère hémolytique :

Parmi les 200 nouveau-nés examinés, 13 ont présenté dans les heures suivant la naissance un ictère hémolytique par iso-immunisation. Sauf pour trois d'entre eux, la courbe de résistance globulaire osmotique se trouve dans les limites de la normale (*fig.* 9-10).

Les résultats que nous avons consignés dans le tableau ci-après (*tableau* 7) montrent que la résistance globulaire :

— n'est pas nécessairement abaissée au cours d'un ictère hémolytique ;

— que l'ictère ne semble pas conférer à l'hématie postérieurement à son apparition une fragilité particulière ;

— il est évident que la fragilisation excessive des hématies, si elle n'est pas suivie d'hémolyse ne s'accompagne pas d'hyperbilirubinémie. A l'inverse, l'hyperrésistance osmotique n'exclut pas la présence d'un taux élevé de bilirubine plasmatique.

Il est alors logique de penser que l'hémolyse par iso-immunisation, donc de cause extra-globulaire, s'exerce, quelles que soient les conditions de fragilité de l'hématie. Si l'hématie ne se trouve pas préventivement fragilisée en cas d'ictère, il est permis de comprendre pourquoi les nouveau-nés présentant un IHNN ne naissent pas anémiques.

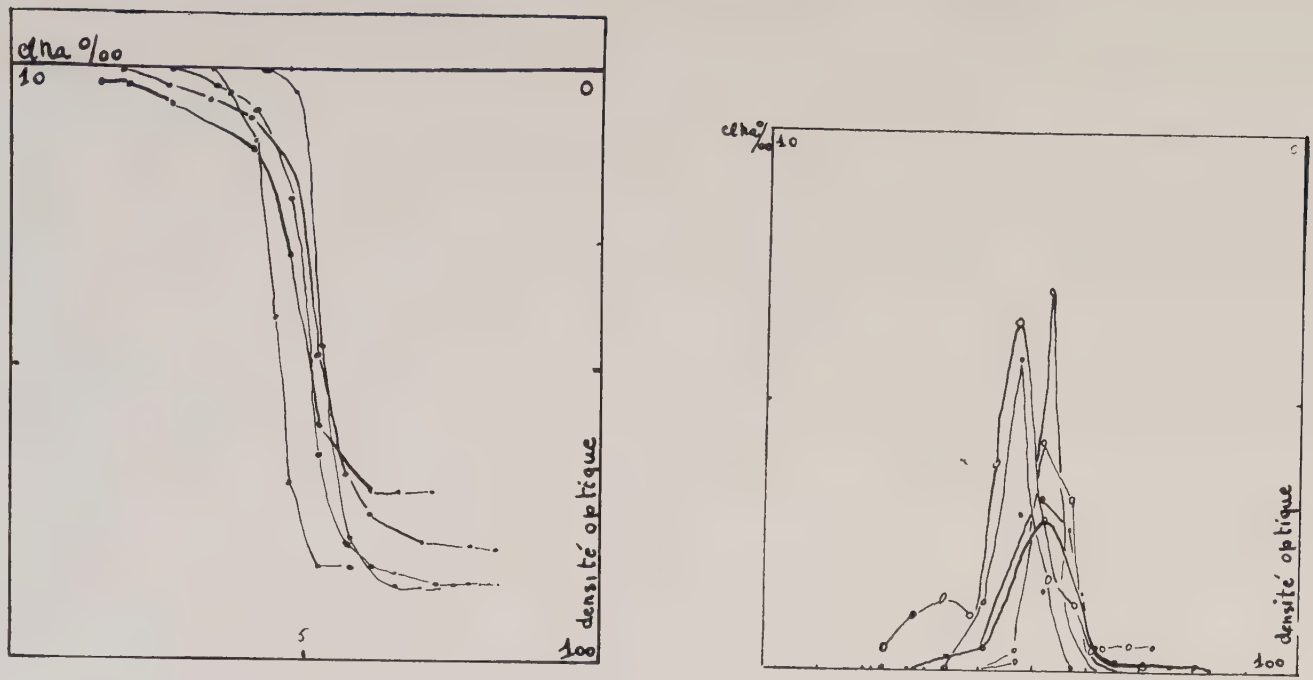

FIG. 9. — Courbes d'hémolyse (1) et leurs expressions différentielles (2) dans 5 cas d'ictères hémolytiques néo-nataux.

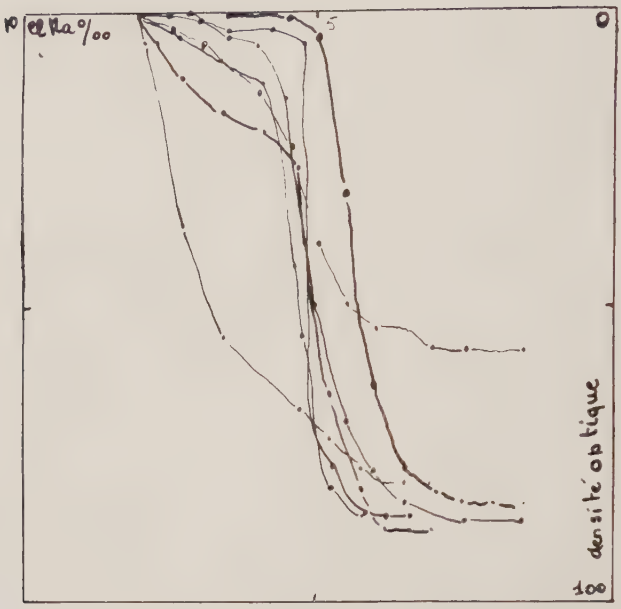

Fig. 10. — Courbes d'hémolyse (3) et leurs expressions différentielles (4) dans 7 cas d'ictères hémolytiques néo-nataux.

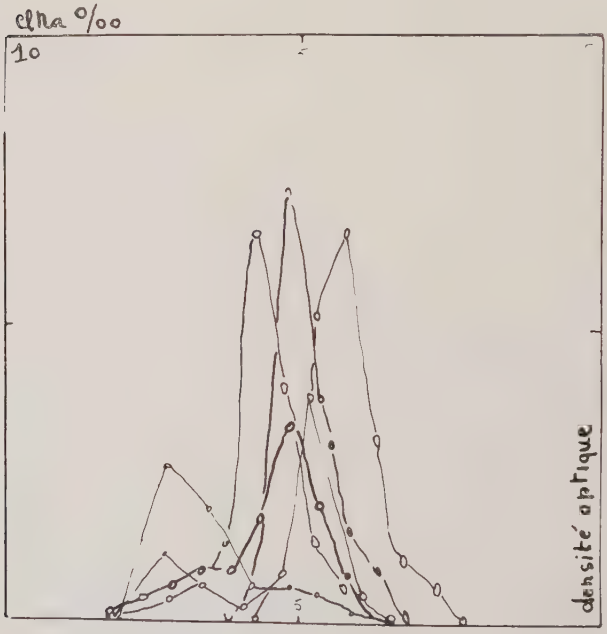

TABLEAU 7

Noms	*Bilirubine totale en mg p. mille*	*Bilirubine indirecte en mg p. mille*	*Résistance globulaire*	*Population d'hématies*	*hypo*	*Pourcentage normo*	*hyperrésistante*
Am...	3,7	3,3	7,5 - 3,9	2	9,9 %	90,1 %	0
Re...	4,1	3,8	7,4 - 3,8	1	0	100 %	0
Pa...	5,6	4,8	5,8 - 2,5	1	0	100 %	0
Es...	4,5	3,8	6,6 - 2,5	2	0	96 %	4 %
Ue...	5,6	5	6,6 - 3,1	1	0	100 %	0
Re...	7,5	7	7,2 - 4,3	1	0	100 %	0
De...	8,6	7,7	7,7 - 4,9	2	21 %	79 %	0
Se...	8,5	7,7	6,2 - 2,8	1	0	100 %	0
Le...	15,5	14,8	5,3 - 3,3	1	0	100 %	0
Ju...	15,1	14,2	7,9 - 3,9	1	100 %	0	0
Me...	16,9	15,5	4,7 - 2,8	1	0	0	100 %
Ro...	20,1	19,1	6,3 - 4,8	1	0	100 %	0
Ca...	32	31,5	5,3 - 3,5	1	0	100 %	0

Tableau des valeurs comparées des taux de bilirubine, de la résistance globulaire et des populations d'hématies.

CONCLUSION

Dans la première partie de ce travail, nous avons rappelé le mécanisme de l'hémolyse chez l'adulte, l'enfant et le nourrisson, et surtout chez le nouveau-né. L'étude de la physiologie de l'hémolyse néo-natale nous a paru particulièrement intéressante. En effet, elle entre dans le cadre des phénomènes d'adaptation du nouveau-né à la vie extra-utérine. Le chiffre élevé des globules rouges fœtaux s'abaisse au cours des premiers jours de la vie, pour atteindre le taux normal de l'adulte très rapidement, et les constituants globulaires sont modifiés en fonction des nouvelles conditions dans lesquelles se trouve l'organisme : il se produit une augmentation brutale et importante de la tension d'oxygène, des variations des volumes plasmatiques et globulaires. L'hémoglobine adulte remplace progressivement l'hémoglobine fœtale dont la synthèse ne s'effectue plus en dehors de certains cas pathologiques.

Nous avons ensuite étudié le processus de l'hémolyse osmotique expérimentale, en considérant ses différents stades et l'interprétation mathématique qu'en a donnée PONDER. Les modifications de la forme des érythrocytes provoquées par des variations du pH, de la température et de la tonicité du milieu de suspension ont été envisagées, ainsi que la notion très controversée de la « réversibilité du phénomène hémolytique ».

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons rapporté notre expérience personnelle basée sur l'examen de 200 échantillons de sang de cordon. Nous avons utilisé une méthode originale de détermination de la résistance globulaire osmotique

se distinguant des autres techniques par un mode de distribution des solutions salées hypotoniques tel qu'il minimise les risques d'erreur, tout en évitant de longues et fastidieuses manipulations. De plus, la transcription graphique du degré d'hémolyse obtenue pour chaque concentration saline nous a permis d'étudier avec plus de précision le phénomène de la résistance globulaire représentée par une courbe de variation de l'hémolyse et son expression différentielle.

Ces recherches expérimentales amènent, en résumé, aux conclusions suivantes :

1. — Chez le nouveau-né normal, les érythrocytes commencent à hémolyser dans des solutions titrant 0,68 % à 0,54 % de Cl Na et sont totalement détruits dans des solutions à 0,30 %. La fragilité moyenne des hématies se situe vers 0,47 %.

2. — Chez l'adulte, l'enfant et le nourrisson, l'expression différentielle de la courbe d'hémolyse obtenue est une courbe de Gauss, unique. Ceci signifie que toutes les hématies ont la même résistance aux solutions salines hypotoniques. Chez le nouveau-né, on obtient le plus souvent deux ou plusieurs segments graphiques, en forme de courbe de Gauss. L'hétérogénéité de la population érythrocytaire apparaît comme un reflet des phénomènes d'adaptation à un nouveau mode de vie.

3. — Nous avons recherché les rapports de la résistance globulaire du nouveau-né avec d'autres constantes biologiques.

a) Classiquement, les réticulocytes confèrent au sang de cordon une fragilité osmotique diminuée. Nous avons établi le pourcentage des réticulocytes par rapport aux hématies et celui des populations hyperrésistantes. Le taux et la valeur des populations hyperrésistantes ne sont pas proportionnels à la quantité de réticulocytes.

b) Selon nos conclusions, l'hémoglobine alcalino-résistante, par contre, confère à l'hématie une augmentation de sa résistance à l'hypotonie. L'érythrocyte est d'autant moins fragile qu'il contient davantage d'hémoglobine fœtale.

c) Nous avons comparé la fragilité des érythrocytes de 13 ictères hémolytiques néo-nataux et celle de sujets normaux. L'ictère ne semble pas influer sur la résistance globulaire et les hématies d'un nouveau-né ne sont pas fragilisées avant l'apparition de l'ictère.

Vu : *le Président de la Thèse,*
GUILHEM.

Vu : *le Doyen,*
LAZORTHES.

Vu et permis d'imprimer :

Toulouse, le 1er février 1964.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
LOYEN.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abramson (H.A.), Moyer (L.S.), Gorin (M.H.). — Electrophoresis of Proteins. Reinhold publishing corp., New-York, 1942, cité d'après 5.

2. Agnisetta et Massenti (S.). — *Minerva Medica,* 1953, 44, 661.

3. Allison et Burns. — Cité d'après 93.

4. Ashby (W.). — *Americ. J. Physiol,* 1924, 68, 239.

5. Azzopardi (O.). — Contribution à l'étude de la Résistance globulaire et de son comportement dans les principales dyshémoglobinoses héréditaires. *Thèse pharmacie,* Montpellier, 1956, n° 26.

6. Bayliss. — *J. Physiol.,* 1924, 59, 48.

7. Beebe (R.T.) et Hanley (E.P.). — *Journal of Lab. and Clin. medecine,* 1936, 21, 883.

8. Beer. — Cité d'après 3.

9. Bénard (H.), Dantchev (D.) et Gajdos (A.). — *C.R. Soc. Biol.,* 1955, 149, 1770.

10. Bessis. — Traité de Cytologie sanguine. Masson, Paris, 1954.

11. Bessis. — La maladie hémolytique du nouveau-né. Masson, Paris, 1947.

12. Bessis et Bricka. — Etudes au microscope électronique sur l'hémolyse, l'agglutination, la forme et la structure des globules rouges. *Revue d'hématologie,* 1950, 5, 396.

13. Bolton (J.H.). — *Blood,* 1949, 4, 172.

14. Bory (L.). — Les phénomènes de destruction cellulaire. Masson, Paris, 1922.

15. Brinkmann et Szent-Gyorgyi. — *Journ. Physiol.,* 1923, 58, 208.

16. Brooks (J.C.). — *Tourn. Gen. Physiol.,* 1919, 3, 16.

17. Brugsch et Hess (J.). — Z. Ges. inn. Med. *Grenzgeb.*, 1948, 3, 383. Cité d'après 5.

18. Butler. — Cité d'après 5.

19. Cabannes (R.). — Etiologie et pathologie des anémies hémolytiques de cause globulaire. *IV^e Congrès national transf. sang.*, juin 1962, p. 15.

20. Cabannes (R.), Bierme (R.), Beurrier (A.), Le Doussal (V.). — Etude de la résistance globulaire chez le nouveau-né, chez le nourrisson et chez l'enfant au cours de certains états pathologiques. *Ann. Biol. Clin.*, 1963, 21, 609.

21. Cathala et Daunay. — Cité d'après 41.

22. Cazal. — Erythrocytes et érythropathies. Masson, Paris, 1957.

23. Chanel (L.). — Recherche sur la résistance des hématies. *Thèse,* Lyon, n° 52.1880. Cité d'après 57.

24. Chauffard (M.A.). — Pathogénie de l'ictère congénital de l'adulte. *Semaine Médicale,* 1907, 27, 25. Cité d'après 30.

25. Commandon et Fonbrune. — Contribution de l'étude du mécanisme de l'hémolyse. *Arch. Anat. Microsc.*, 1929, 25, 555-570.

26. Cox (R.T.). et Ponder (F.). — *Journ. Gen. Physiol.*, 1941, 24, 619.

27. Creed (E.F.). — *Journ. of Path. and Bact.*, 46, 331.

28. Cristol et Bénézech. — Cité d'après 22.

29. Dacie (J.V.) et Vaughan (J.M.). — *Journ. of Path. and Bact.*, 1938, 36, 341.

30. Daland et Worthley. — The resistance of red blood cells to hemolysis in hypotonic solutions of Sodium chloride. *J. Lab. and Clin. med.*, 1935, 20, 1122.

31. Debré. — *Pédiatrie,* tome I, 68.

32. Diacono (H. et G.). — *Revue d'hématologie,* 1953, 5, 299.

33. Diacono (H.). — L'hémolyse. Maloine édit., Paris, 1934.

34. Doisy et Eaton. — 1921. Cité d'après 29.

34 *bis*. Doxiadis, Fessas, Valaes. — Glucose-6-phosphate deshydrogenate deficiency. *Lancet,* 7172, 11 février 1961, pp. 297-301.

35. Dreyfus et Kruh. — Cité d'après 84.

36. Duncan. — Cité d'après 5.

37. Duong-Ba-Banh. — Recherches sur l'ictère physiologique du nouveau-né. *Presse Médicale,* LIX, pp. 892-893.

38. Fujimori. — Cité d'après 41.

39. Furchgott (R.F.) et Ponder (E.). — *J. Exp. Biol.,* 1940, 17, 117.

40. Gallo et Tolentino. — *Arch. « E Maraglione » de Pat. e. clin.,* 1948-1949, 3, 1285.

41. Gentet (M.). — Les limites de l'ictère dit « physiologique » du nouveau-né. *Thèse,* Paris, 1960, n° 283.

42. Gilbert et Le Reboullet. — Cité d'après 41.

43. Gilbert et Goodman. — *Am. Journ. Phy.,* 1937, 118, 241.

44. Goldblum et Gottlieb. — *Am. Journ. Dis. Child.,* 1929, XXXVIII, 57. Cité d'après 47.

45. Goldbloom, Vischer, Reinhold et Hsia. — *Blood,* 1953, 8, 165.

46. Gough (A.). — *Biochem. J.,* 1924, 18, 202.

47. Guest (G.M.). — *Blood,* 1948, 3, 541.

48. Guest (G.M.) et Wing (M.). — *Journ. Lab. and Clin. med.,* 1934, 24, 850.

49. Haleham-Shu-Shu-Shen. — Studies on the destruction of red blood cells. *Blood,* 1948, t. 3, 373.

50. Hamburger. — Cité d'après 5.

51. Hampson et Maizels. — 1926-1927. Cité d'après 29.

52. Hendrickse (R.G.) et Watson-Williams (E.S.). — *British med. Journ.* 1961, 11, 1686.

53. Hendry (E.B.). — *Edin. Med.* 5, 1964, 61, 7. Cité d'après 5.

54. Hsia. — Cité d'après 31.

55. Hunter (F.T.). — *J. Clin. Investigations,* 1940, 19, 601.

56. Jacobs et Parpart. — Cité d'après 29.

57. Jolly. — Traité technique d'hématologie. Edit Maloine, Paris, 1923.

58. Jouly. — Cité d'après 5.

59. Leake et Pratt. — Cité d'après 29.

60. Lepeschkin (W.W.). — *J. Lab. clin. med.,* 1932, 17, 1250. Cité d'après 5.

61. Malassez (M.L.). — *Thèse doct.,* Paris, 1873, n° 17. Cité d'après 5.

62. Maier (C.). — Medizinischer Verlag Hans Huber, Bern, 1950.

63. Mayer (M.). — Etiologie et pathogénie des anémies hémolytiques acquises non immunologiques. *IV^e Congrès national transf. sang.,* juin 1962, p. 136.

64. Mayer et Schaeffer. — *J. Phys. Path. Gen.,* 1914, 16, 1.

65. Mollison. — Cité d'après 81.

66. Mosso (A.). — *Arch. ital. Biol.,* 1887, 8. Cité d'après 5.

67. Parpart (A.K.) et Dziemian (A.J.). — *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology,* 1940, 8, 17. Cité d'après 5.

68. Pellegrini. — *Haematologica,* 1934, 15, 389.

69. Philippot (J.). — *Biologie médicale,* avril 1963.

70. Polonowski (M.) et Gajdos (A.). — Physiologie des globules rouges. *Enc. méd. Chir. Sang.,* I, 13 000 E., 10.

71. Ponder (E.). — The osmotic behaviour R of crenated cells. *J. of Gen. phys.*, 1943-44, 27, 273.

72. Ponder (E.). — Hemolysis and related phenomena. Grune et Stratton édit., New-York, 1948.

73. Ponder (E.). — The mechanism of the inhibition of hemolysis. *Journ. of gen. physiol.*, 1943, 27, 1.

74. Ponder (E.). — *Blood*, 1948, 556.

75. Ponder (E.). — *Annales de biologie clinique*, avril 1962, n° 3, 4, p. 7.

76. Ponder (E.). — The Kinetics of in vivo hemolytics system. *Journ. Gen. of Phys.*, 1944, 27, 483.

77. Ponder (E.), Bessis, Breton-Gorius. — Observations au microscope électronique de l'action de différentes hémolysines sur la surface des globules rouges. *Revue d'hématologie*, 1953, 8, 227.

78. Ponder et Saslow. — *Quart. J. Exp. physiol.*, 1929, 19, 319.

79. Prankerd (T.A.J.). — *Quart. Journ. of medecine*, p. 1340.

80. Prankerd (T.A.J.). — The Red Cells. Brackwell. Oxf. Edit.

81. Quillet (P.). — L'hyperbilirubinémie néo-natale. *Thèse médecine*, Paris, 1962, n° 2.

82. Rossier (A.). — *Enc. Méd. Chir. pédiatrie*, I, 4002, p. 10.

83. Sachetta (R.A.). — *Acta. argent. Fisiol. Fisiopatol.*, 1954, 4, 105. Cité d'après 5.

84. Salmon. — Syndromes hémolytiques par hétéro et iso-immunisation. *IV^e Congrès national transf. sang.*, juin 1962, p. 44.

85. Schapira (G.) et Rosa (J.). — *Ann. Biol. clin.*, mars-avril 1962, n° 3-4, p. 14.

86. Schiff. — Cité d'après 41.

87. Schegel et coll. — Cité d'après 84.

88. Simmez. — *Deutsch. Arch. Flin-med.*, 1923, 142, 252.

89. Sjolin. — *Acta. Paed. Uppsaza.*, 1954, 43, 5. Cité d'après 5.

90. Slingenberg. — Cité d'après 41.

91. Starlinger (W.). — *Z. Ges. exper. med.*, 1925, 47, 407. Cité d'après 5.

92. Steinbuch (M.). — *Semaine des Hôpitaux de Paris*, 1954, 52-53, 3062.

93. Suess. — Cité d'après 5.

94. Torres (J.). — Contribution à l'étude de l'hémolyse. *Thèse*, Toulouse 1958.

95. Van Slyke et Mac Lean. — 1923. Cité d'après 29.

96. Vella. — *East African Medical Journal*, mai 1962, p. 190.

97. Viale. — Cité d'après 5.

98. Viola (G.). — *Policlin. Sez. med.*, 1902, 9, 581. Cité d'après 5.

99. Waugh (T.R.) et Chase (W.H.). — *J. Lab. Clin. med.*, 1928, 13, 872. Cité d'après 5.

100. Whitby (L.) et Hynes (M.). — *Journ. Path. and Bact.*, 1935, 40, 219.

101. Widal (F.), Abrami (P.) et Brule (M.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1907, 63, 346. Cité d'après 5.

102. Wiseman et Bierbaum. — *Proceedings society exp. biol. and med.*, 29, 835.

103. Wolpers (C. Von). — Zur Feinstruktrez der Erythrocytenmembran. *Die Naturwiss.*, 1941, 28, 416-19.

104. Wolpers (C. Von) et Zmichau (F.). — Zur Frage der Erythrocytenmembran. Folio *Haematologica*, année 1942, 65, 211-221. Cité d'après 52.

105. Zade-Oppen. — *Scand. J. Clin. Lab. invest.*, 1953, 5, 199.